

CULTURE DE CELLULES MALPIGHIENNES A PARTIR DE L'ÉPIDERME DE COBAYE IRRADIE PAR LES RAYONS X

Travail du Groupe de Recherches sur les relations VIRUS-CANCER
de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale :

Directeur : Prof. R. SOHIER

Maître de Recherches : Prof. Ag. PRUNIERAS
et des Services d'Electro-Radiologie et de Dermatologie
de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 6 DÉCEMBRE 1965

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

par

RAMANIRAKA Gabriel

Ancien élève de l'Ecole du Service de Santé Militaire de Lyon

Né le 15 Novembre 1936 à TONGOBOREY (Betioky)

Province de Tulear - MADAGASCAR



IMPRIMERIE DES BEAUX-ARTS
J. TIXIER & FILS, 19, RUE ROUX-SOIGNAT, LYON

1965

CULTURE DE CELLULES MALPIGHIENNES

A PARTIR DE L'ÉPIDERME DE COBAYE

IRRADIÉ PAR LES RAYONS X

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyens honoraires :

MM. J. LÉPINE
H. HERMANN

Membre de l'Institut.
Correspondant de l'Institut.

Doyen :

J.F. CIER

Assesseurs : MM. M. LEVRAT
L. REVOL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. PATEL, LÉPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, GARIN, GATÉ, MARTIN,
GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET, POLLOSSON

PROFESSEURS

MM. CIBERT	Clinique urologique
PONTHUS (détaché à Beyrouth)	Physique biologique
DECHAUME	Clinique neuro-psychiatrique et d'Hygiène mentale
CHAMBON	Chimie organique et Toxicologie
WERTHEIMER	Clinique chirurgicale B
PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
FROMENT	Clinique et Prophylaxie cardio-vasculaires
CROIZAT	Clinique médicale C
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
REVOL	Pharmacie galénique
PIGEAUD	Clinique obstétricale
BOURRET	Médecine du Travail
LEVRAT	Clinique médicale A
SOHIER	Hygiène et Action sanitaire et sociale
NETIEN	Botanique et cryptogamie
BERTRAND	Clinique chirurgicale C
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
DREVON	Pharmacie chimique et pharmacologie
ROCHE	Médecine légale et déontologie
COUDERT	Parasitologie et Pathologie exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique d'oto-rhino-laryngologie et d'audio-phonologie
PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique
THIERS	Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie
BRUN	Clinique de pneumo-phthisiologie
CREYSSEL J.	Clinique traumatologique des membres
DARGENT	Clinique carcinologique
GUICHARD	Anatomie pathologique
GIRARD P.	Pathologie générale et expérimentale
LATARJET	Anatomie
PEYCELON	Pathologie chirurgicale
GIRARD M.	Thérapeutique
VACHON	Pathologie médicale
GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires
PAPILLON	Radiologie
JEUNE	Clinique infantile et hygiène du premier âge
GONIN	Hydrologie thérapeutique, Climatologie et Ecologie sociale
MONNET	Bactériologie
BANSSILLON	Physiologie et pathologie obstétricales
CHATONNET	Physiologie B
GUINET	Clinique endocrinologique
TRILLAT	Clinique de Chirurgie orthopédique
FREIDEL	Clinique Stomatologique
MARION J.	Clinique de Chirurgie et d'Orthopédie infantiles
DORCHE	Matière médicale et législation pharmaceutique
DUMONT L.	Histologie et embryologie
PERROT	Chimie
CIER J.F.	Physiologie A
PERRIN J.	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire
MICHAUD P.	Clinique de Chirurgie cardiaque
MATHIEU	Clinique gynécologique
FAUCON	Biologie médicale et pharmacodynamie
BERTOYE	Clinique des maladies infectieuses
X...	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale
X...	Clinique biologique et médicale
X...	Clinique médicale infantile

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

MM. BERGER	Physique nucléaire appliquée à la médecine
MANSUY	Neuro-chirurgie
COLLET	Chimie générale et pharmaceutique
LACROIX	Hygiène et climatologie
LIARAS	Clinique chirurgicale propédeutique
LECUIRE	Neuro-chirurgie
REVOL	Médecine générale
GOINARD	Thérapeutique chirurgicale
CIER A.	Pharmacie chimique et Pharmacologie
PONT M.	Médecine générale
TRAEGER	Pathologie médicale et rénale

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

MM. ROMAN	Parasitologie	MM. De SOLLIERS	Chimie analytique
FEROLDI	Anatomie pathologique	DESPIERRE	Médecine générale
MORET	Physique biologique	GARIN	Parasitologie
ODDOUX	Botanique et cryptogamie	TOLOT	Médecine du Travail
		THIVOLET	Hygiène

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS TITULAIRES

MM. CREYSSSEL R.	Chimie biologique	MM. MICHEL	Anesthésiologie
PINET	Electro-radiologie	MICHOULIER	Chirurgie générale
GUYOTAT	Neuro-psychiatrie	COLOMB	Dermatologie
DESCOTES	Chirurgie générale	LAMBERT	Médecine générale
JOUVET	Pathologie expérimentale	FRIES	Médecine générale
PEYRIN	Physique biologique	GILLY	Pédiatrie
TOMMASI	Anatomie pathologique	ROBERT	Médecine générale
BUFFARD	Electro-radiologie	BOUCHET	Anatomie
LEJEUNE	Méd. gén. et thérapeutique	BETHENOD	Pédiatrie
De MOURGUES F.	Stomatologie	GERMAN	Immunologie, sérologie,
NAUSSAC	Maladies infectieuses		hématologie
REBOUILLAT	Chirurgie générale	KALB	Pneumo-phthisiologie
ROMAGNY	Pédiatrie	LARBRE	Pédiatrie
DELAHAYE J	Médecine générale	SOUSTELLE	Chirurgie générale
DELEUZE R.	Anesthésiologie	VIALA	Médecine générale
GIRAUD M.	Electro-radiologie diagnos-	VINCENT	Bactériologie, parasitologie,
	tic et thérapeutique.		virologie
FRANÇOIS	Pédiatrie et puériculture	COLIN	Médecine légale
		BERTRAND	Chimie biologique

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS STAGIAIRES

MM. FAVRE-GILLY	Hématologie	MM. RIFFAT	Hygiène
GIROD	Histologie et embryologie		macodynamie
GRAS	Chimie biologique	FLANDROIS	Physiologie
MALLEIN	Chimie analytique	VALLIER-RATYARD	Bactériologie
		ROLLET	Pharmacie galénique

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. MARION P.	Chirurgie générale	MM. GAILLARD	Oto-rhino-laryngologie
BONAMOUR	Ophthalmologie	GARDE	Médecine générale
De MOURGUES G.	Chirurgie générale	HUGONNIER	Ophthalmologie
DEVIC	Médecine générale	MARET	Chirurgie générale
DUMONT M.	Obstétrique	MORNEX	Médecine générale
DURAND	Urologie	NORMAND	Médecine générale
FRANCILLON	Chirurgie Générale	PERRIN A.	Médecine générale
SAUBIER	Chirurgie générale	DUMAS	Stomatologie
SCHOTT	Neuro-psychiatrie	GARMIER	Obstétrique
ALLEGRE	Neuro-chirurgie	NOEL	Médecine générale
CHASSARD	Electro-radiologie	SCHNEPP	Orthopédie
FAYSEE	Orthopédie	NOTTER	Gynécologie obstétricale

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. J. PAPILLON, Président ; A. CIER, MORET, PERES, M. PRUNIERAS, Assesseurs.

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

CULTURE DE CELLULES MALPIGHIENNES A PARTIR DE L'ÉPIDERME DE COBAYE IRRADIE PAR LES RAYONS X

Travail du Groupe de Recherches sur les relations VIRUS-CANCER
de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale :

Directeur : Prof. R. SOHIER

Maître de Recherches : Prof. Ag. PRUNIERAS
et des Services d'Electro-Radiologie et de Dermatologie
de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 6 DÉCEMBRE 1965

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

par

RAMANIRAKA Gabriel

Ancien élève de l'Ecole du Service de Santé Militaire de Lyon

Né le 15 Novembre 1936 à TONGOBORY (Betioky)

Province de Tulear - MADAGASCAR



IMPRIMERIE DES BEAUX-ARTS
J. TIXIER & FILS, 19, RUE ROUX-SOIGNAT, LYON

1965

A MON PÈRE

Gilbert RAMANIRAKA

Médecin principal de l'A.M.M. - Inspecteur des écoles

Vous avez fait naître en moi la vocation médicale par votre grande conscience professionnelle, votre dévouement et votre amour pour l'humanité souffrante.

L'espoir de vous apporter quelque joie inspira ce travail.

A MA MÈRE

Vous avez été pour vos enfants l'abnégation même.

Vos sacrifices n'ont pas été vains.

Aucun mot ne saurait traduire ici, ma chère maman, l'étendue de ma reconnaissance et la profondeur de mon affection.

A MON FRÈRE

Rakotonirina RAMANIRAKA

Administrateur Civil

Vous avez été pour nous un grand frère dévoué. Vous nous avez sacrifié votre jeunesse, votre bonheur même. Je suis heureux de vous témoigner ici toute ma reconnaissance et mon affection fraternelle.

A MA FEMME

Cette thèse lui est dédiée. Compagne dévouée, fidèle et prévenante, elle a été pour moi le soutien moral indispensable tout au long de ce travail. Je suis heureux de lui exprimer ici ma joie de l'aimer.

A MON PETIT OLIVIER et à MA CHÈRE EVELYNE

Vous êtes le but de ma vie.

A MA CHÈRE GRAND-MÈRE

Avec toute mon affection filiale.

A MES BEAUX-PARENTS

Madame et Monsieur Jean LERNOUT
Ingénieur

En témoignage de l'affection que je leur porte et en remer-
ciement des années heureuses vécues auprès d'eux.

A MON BEAU-FRÈRE : RAKOTOSON Jules

Avec toute mon affection.

A Madame RAZAFINDRAMIZA Christine
et à Madame RANAIVOSOA

Je les remercie pour tout ce qu'elles ont fait pour ma femme
et pour l'attention affectueuse qu'elles m'ont portée.

A MES FRÈRES ET SŒURS

RAMANIRAKA Rakotomalala
Administrateur Civil

RAMANIRAKA Rajosoa
Attaché d'Administration (Paris)

Madame ANDRIAMBOLOLOIINA - Née RAMANIRAKA
Professeur licenciée en Philosophie

et Monsieur ANDRIAMBOLOLOIINA
Professeur de Sciences

RAMANIRAKA Charles
Secrétaire d'Administration (Paris)

RAMANIRAKA Angéline
Etudiante en Médecine

RAMANIRAKA Gilberte

RAMANIRAKA Claude Anthony

Avec toute mon affection.

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur J. PAPILLON

Professeur de Radiologie à la Faculté de Médecine de Lyon

Radiologiste des Hôpitaux

Nous sommes sensibles au grand honneur qu'il nous a fait et à la confiance qu'il nous a témoignée en acceptant la présidence de notre jury de thèse.

Qu'il veuille bien accepter l'hommage de notre respectueuse reconnaissance.

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Monsieur le Professeur Agrégé PRUNIERAS M.

Maître de Recherches à l'I.N.S.E.R.M.

Pendant les 14 mois que nous avons passés au sein de son Groupe, il a guidé nos premiers pas dans la recherche avec une attention patiente et une très grande bienveillance.

Nous avons pu apprécier sa compétence, sa très haute valeur scientifique et la délicatesse de son cœur. Nous lui exprimons notre fierté de nous compter parmi ses élèves.

A NOS JUGES

A Monsieur le Pharmacien Lieutenant-Colonel André CIER

Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon

Chef de la Division de Chimie et Pharmacologie
du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées

Nous le remercions de l'honneur qu'il nous fait en acceptant de faire partie de notre jury et nous le prions de croire à notre respectueuse et profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur MORET

Professeur de Physique Médicale à la Faculté de Médecine de Lyon

Il voudra bien trouver ici l'expression de notre reconnaissance pour l'enseignement qu'il nous a dispensé pendant nos deux premières années de Médecine, et pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de juger notre travail.

A Monsieur le Professeur Gabriel PERES

Professeur de Physiologie générale et comparée
Chef du Service de Physiologie générale et comparée
de la Faculté des Sciences de Lyon

Nous le comptons parmi nos meilleurs maîtres. Il nous a donné, grâce à son enseignement, une formation scientifique solide qui nous a été ultérieurement utile dans l'élaboration de ce travail. Qu'il veuille bien accepter ici l'hommage de notre respectueuse reconnaissance.

A NOS PROFESSEURS DE LA FACULTÉ
ET A NOS MAÎTRES DES HOPITAUX CIVILS ET MILITAIRES

A la mémoire :

Du Professeur JOLY

Ancien Professeur à l'Ecole Supérieure des Sciences de Rouen

Reconnaissance et regrets éternels.

A Monsieur le Professeur R. SOHIER

Professeur d'Hygiène et d'Action Sanitaire et Sociale à la Faculté de Médecine
Directeur des Groupes de Recherches de l'I.N.S.E.R.M. à Lyon

Nous avons eu l'honneur de bénéficier de son enseignement à la Faculté et il nous a accueilli avec amabilité dans son Service. Nous tenons à lui exprimer ici toute notre reconnaissance.

A Monsieur le Médecin Général Inspecteur BORON

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce
Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
et de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes

Il nous a toujours accueilli avec la plus grande bienveillance, ses conseils et ses encouragements nous furent très précieux. Nous sommes heureux de lui exprimer ici notre vive reconnaissance.

A Monsieur le Médecin Colonel GROSSETETE

Bactériologiste des Hôpitaux des Armées
Médecin Chef de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes
Sous-Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Hommage respectueux.

A Monsieur le Médecin Colonel MAITRE

Spécialiste des Hôpitaux Militaires
Chef du Laboratoire de Bactériologie
Médecin-Chef du Service des Contagieux à l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes

Il nous a accueilli avec gentillesse dans son Service et a mis son Laboratoire à notre disposition. Nous lui exprimons notre vive gratitude et l'hommage de notre profond respect.

A Monsieur le Médecin Lieutenant Colonel COUTURE

Chef du Service de Radiologie à l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes
Electro-Radiologiste des Hôpitaux des Armées

Il nous a accueilli avec bienveillance dans son Service et il s'est occupé personnellement de la partie Radiologique de ce travail. Nous lui exprimons notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Médecin Lieutenant Colonel PAPET

Chef du Service de Physiothérapie à l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes
Electro-Radiologiste des Hôpitaux des Armées

Nous avons pu apprécier sa haute compétence technique alliée à une charmante bienveillance. Nous le remercions de l'aide précieuse qu'il nous a apportée. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

A Monsieur le Médecin Lieutenant Colonel BONJEAN

Chef du Service de Dermato-Vénéréologie à l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes
Spécialiste des Hôpitaux des Armées

Nous avons acquis dans son Service des notions précises de Dermatologie. Il nous a en plus guidé pas à pas dans l'élaboration de ce travail; ne nous ménageant ni son temps ni sa patience. Nous lui devons beaucoup. Qu'il trouve ici le témoignage de nos sentiments dévoués et de notre plus vive reconnaissance.

A Monsieur le Médecin Lieutenant Colonel FELIX

Chef du Service de Médecine générale à l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes
Professeur Agrégé du Val-de-Grâce

Pendant tout un semestre nous avons appris dans son Service notre métier de Médecin et nous avons été conquis par son affabilité et son remarquable sens clinique. Qu'il sache ici toute l'admiration qu'il nous inspire.

A Monsieur le Médecin Lieutenant Colonel Maurice GLOAGUEN

Ancien Major de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Avec l'expression de notre profonde reconnaissance et de nos sentiments respectueux,

A Monsieur le Médecin Lieutenant Colonel AMIOT

Major de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Hommage respectueux.

A Madame et Monsieur Georges ESCARGUEIL

Administrateur en Chef de Classe Exceptionnelle de la F.O.M.

Leurs conseils et leur soutien moral nous ont été précieux pendant nos années d'études. Nous sommes heureux de leur témoigner ici toute notre gratitude et notre profonde reconnaissance.

A Madame et Monsieur Lucien CHAVENT et leurs enfants

Ils ont créé autour de nous une ambiance familiale douce à laquelle nous avons été extrêmement sensible. Nous conserverons de cette famille le plus fidèle des souvenirs.

A Madame et Monsieur RAGOT

Leur foyer a été pendant longtemps celui d'un jeune élève officier sans famille lors de ses permissions. Qu'ils veuillent bien trouver ici le témoignage des sentiments d'affection que je leur porte.

A Madame la Doctoresse et Monsieur le Docteur HOUVER

En remerciement de leur accueil aimable et bienveillant.

A Madame et Monsieur Hubert CHAIGNE

En souvenir des longues années passées ensemble avec leurs fils à Madagascar.

A Mademoiselle J.F. WORBE

Docteur ès-Sciences

Nous lui exprimons notre vive gratitude pour l'intérêt qu'elle a porté pour nous.

A Mademoiselle FARGIER

Elle nous a apporté avec dévouement une collaboration technique précieuse. Nous sommes heureux de lui témoigner ici notre gratitude.

A Mesdemoiselles M.F. MATHIVON et M. REGNIER

Elles nous ont amicalement aidé avec gentillesse dans l'élaboration de ce travail. Nous leur exprimons notre vive reconnaissance.

Au Docteur ROUSSEAU Jacques

Externe des Hôpitaux

En témoignage d'une amitié solide qui s'est nouée le premier jour du concours d'entrée à l'Ecole et qui ne s'est jamais démentie depuis, malgré le temps et la séparation.

Au Docteur Charles KAMDOUM

En souvenir des années vécues ensemble, des joies et des peines que nous avons partagées.

Au Docteur REZA MASSOUMI

Son amitié nous est toujours très précieuse malgré l'éloignement de nos deux pays.

Au Médecin Capitaine SEKKAT

Avec toute notre amitié.

A Madame et Monsieur le Docteur EYBALIN et leur fille

Nous avons vivement apprécié les marques d'amitié qu'ils nous ont portées.

Au Docteur BERTAGNOLIO

En l'assurant de toute notre sympathie.

Au Docteur Roger CUNY

Avec notre amitié.

Au Docteur Georges SALIBA

Nous avons vivement apprécié son amitié.

Au Docteur Gérard LUCIEN

Avec toute son affection.

Aux Docteurs :

René LEMONNIER, Jean LARTIGUE, SCHERER, BOTTOS, SMAOUN,
PHITAKSOUNTHONE, BAROUTI, Marcel DE SCHAMPHLAERE

Pour l'amitié qu'ils nous ont témoignée lors de notre mariage.

A tout le Personnel du Laboratoire d'Hygiène
de la Faculté de Médecine et du Service de Dermatologie H.M.I.D.

* A tous nos compatriotes malgaches à LYON

A tous nos camarades de l'Ecole du Service de Santé Militaire

A tous mes amis de France et de Madagascar

INTRODUCTION

Depuis la découverte des Rayons X par ROENTGEN en 1895, leur utilisation n'a fait que croître grâce au développement des techniques et aux acquisitions nouvelles de la physique et de la chimie.

Leurs applications thérapeutiques ont acquis en Médecine une très haute importance et des êtres humains de plus en plus nombreux sont ainsi soumis à leur action.

La peau est la première barrière que les Rayons X rencontrent sur leur trajet. Son étude permet d'observer l'effet de l'irradiation sur le revêtement cutané, aussi bien sur le plan clinique que sur le plan biologique.

Sur le plan clinique, nous savons depuis longtemps que le rayonnement X provoque chez l'homme des accidents locaux cutanés (104) :

a) l'érythème.

Il est l'unique manifestation cutanée quand la dose ne dépasse pas une certaine valeur. La dose nécessaire pour obtenir un érythème varie avec la qualité du rayonnement. C'est une dose de l'ordre de 3.000 r avec un rayonnement émis sous 200 Kv filtré par 1 mm de Cu avec 50 cm de distance focale et administrée 4 à 5 semaines sur un champ de 3 à 300 cm². Avec des rayons mous 120 Kv 1 A1, il suffit de 600 r administrée en moins d'une semaine. L'érythème se manifeste par un trouble fonctionnel de la circulation suivi ultérieurement par une desquamation furfuracée, une pigmentation légère et une épilation temporaire totale ou en clairière.

b) la radio-nécrose aiguë diffuse.

Elle survient à la suite d'application d'une forte dose de rayonnement mou. Ce qui la caractérise, c'est l'atteinte de tous les éléments du tégument. Suivant la gravité des lésions on distingue des radiodermites du premier degré, du deuxième degré, du troisième degré.

Ce dernier cas s'accompagne de lésions ulcéreuses et est remarquable par la lenteur de la réparation.

c) la radio épidermite de REGAUD et NOGIER ou radiodermite élective.

Cette forme est consécutive aux irradiations pénétrantes. Les rayons ne détruisent directement que la couche des cellules génératrices au contact avec le derme. Après une latence d'une dizaine de jours, les cellules les plus superficielles étant tombées, le derme est mis à nu. La réparation se fait en 15 jours à 20 jours. L'épilation se fait à une dose moindre, elle est temporaire ou définitive suivant la dose reçue. L'épilation définitive s'accompagne en général de la destruction des glandes cutanées occasionnant un état de sécheresse de la peau.

d) radiodermite chronique.

Elle survient le plus souvent chez les radiologistes qui ont reçu pendant de nombreuses années un rayonnement de faible intensité, et se caractérise par des phénomènes d'hyperkératose et de sclérodermie ainsi que par des télangiectasies. La radiodermite chronique peut entraîner l'apparition d'ulcère (ulcère roentgenien) et même la cancérisation.

Sur le plan biologique, l'étude de l'effet des rayons X sur les cellules en culture « in vitro » est plus récente et elle continue d'être l'objet de travaux et de colloques scientifiques. L'effet des radiations « in vitro » sur les cellules des mammifères a été étudié par PUCK et MARCUS en 1956, et pour la première fois ils ont déterminé la courbe de survie des cellules en fonction de la dose d'irradiation. Ils ont ensuite décrit les altérations provoquées au niveau de la cellule par ces radiations (98). Ces altérations peuvent se diviser en deux grands groupes :

a) des lésions morphologiques constituées par l'arrêt de la croissance et l'augmentation de taille des cellules.

b) des altérations chromosomiques caractérisées par des cassures, des translocations, des anneaux, le dicentrisme, etc...

Si l'arrêt des mitoses, le retard dans la division cellule sous l'action des rayons X, sont des faits expérimentaux classiques connus depuis longtemps, l'apparition de gigantisme cellulaire par contre, n'a été observée pour la première fois qu'en 1942 par PATERSON, chez le fibroblaste de poulet (82).

PUCK et MARCUS ont confirmé l'observation de PATERSON et ils ont en plus étudié ce gigantisme cellulaire. Les cellules géantes possèdent certaines propriétés, entre autres une susceptibilité accrue à l'infection virale et une dégénérescence rapide en culture (98, 70).

Pour PUCK et POMERAT, cette cellule géante est déjà morte et apparaît comme un résultat de l'effet léthal sur le patrimoine génétique (93, 97). La pathologie des chromosomes quant à elle a été étudiée et réexaminée par d'autres auteurs tels que CHU et collaborateurs (8), BENDER (14), KOHN, FOGH (43) et UMIN' (105). Tous sont unanimes à confirmer les observations de MARCUS et PUCK : les rayons X induisent des aberrations chromosomiques dans les cellules de mammifères « in vitro » sans influence de sexe ni d'âge.

Il ne semble pas interdit de penser que l'effet mutagène des radiations ionisantes sur les cellules puisse se manifester, à condition que les radiations soient suffisamment faibles pour permettre la reproduction mitotique et la croissance des cellules parentales irradiées. L'étude de ces cellules devrait permettre de révéler dans les générations successives l'apparition d'éventuels mutants.

Si l'on connaît assez bien les effets cliniques des rayons X sur l'épiderme et leurs conséquences morphologiques et chromosomiques sur les cellules « in vitro », il semble qu'on ne possède, par contre, que peu de renseignements (à l'exception des cellules du sang et de la moelle) sur la résistance réelle aux radiations des cellules « in vivo ». Il nous a paru intéressant de rechercher l'éventuel effet de l'irradiation sur les cellules cultivées « in vitro », non pas en irradiant la culture mais en irradiant « in vivo » un fragment de tissu épidermique sur un animal vivant et en cultivant

ce fragment secondairement. On peut donc être en mesure d'étudier l'effet bloquant des rayons X sur la multiplication et de rechercher les altérations chromosomiques, traduisant une éventuelle modification du génome cellulaire. Il est alors important de savoir si les altérations observées dans ces cultures sont comparables à celles rapportées par les différents auteurs après irradiation des cultures « in vitro ».

Cette étude de la mise en culture du tissu épidermique après irradiation « in vivo » est un sujet apparemment nouveau ; et nous avons bien conscience qu'une étude biologique complète de cette question dépasse le cadre d'une thèse de Doctorat en Médecine.

Nous avons voulu cependant apporter une contribution modeste, non pas en essayant de fournir à tout prix des résultats spectaculaires mais plutôt en essayant de préciser les premières conclusions expérimentales qui permettront à d'autres de poursuivre notre effort.

Nous avons divisé notre exposé en plusieurs chapitres correspondant aux différents stades expérimentaux de notre travail :

CHAPITRE I

Méthode de mise en culture de l'épiderme de cobaye normal.

CHAPITRE II

Effets cliniques de l'irradiation au niveau des zones destinées aux prélèvements des échantillons d'épiderme à mettre en culture.

CHAPITRE III

Etude du pouvoir de pousse en culture de l'épiderme irradié et non irradié prélevé sur le même animal.

CHAPITRE IV

Observations préliminaires sur les chromosomes des cellules en culture à partir des tissus irradié et non irradié.

CHAPITRE PREMIER

MÉTHODE DE MISE EN CULTURE DE L'ÉPIDERME DE COBAYE NORMAL

La culture de l'épiderme de mammifère adulte peut se réaliser de deux manières par :

- la méthode des explants
- la méthode des cultures dissociées.

La culture d'explant se fait par prélèvement d'un fragment de tissu comprenant l'épiderme et ses couches cornées et une fraction du derme plus ou moins importante. Le milieu de croissance est le plasma de poulet. Du fait de la présence du derme, il y aurait donc prolifération des cellules conjonctives en plus des cellules malpighiennes. Cependant PRUNIERAS, BONJEAN, CHARDONNET et MILLET (87) ont montré que cette méthode est impropre aux expériences d'une durée supérieure à 11 jours, à cause de la prolifération fibroblastique. Il est donc nécessaire d'éliminer les fibroblastes dermiques pour éviter toute confusion et permettre d'étudier le mouvement des cellules épidermiques et leurs rapports entre elles par la microcinématographie. PARSHLEY et SIMMS ont essayé alors de placer les explants dans des conditions défavorables à la croissance des cellules conjonctives en modifiant la solution isotonique du milieu de culture (80, 81) .

FEDOROFF utilise des sérums toxiques pour les fibroblastes (26). Toutes ces tentatives faites pour obtenir une culture pure de cellules épidermiques se sont soldées par des échecs. On a alors abandonné cette méthode des explants pour adopter celle des cultures dissociées qui permettent d'éliminer les fibroblastes avant la mise en culture.

On peut se demander quel est le rôle de la présence du derme dans la multiplication des cellules épidermiques « in vitro ».

Dès 1941, MEDAWAR a montré qu'en plongeant un fragment de peau dans une solution de trypsine, on pouvait obtenir des lambeaux épidermiques débarrassés du derme (74).

En 1952, BILLINGHAM et REYNOLDS (16) ont dissocié par le citrate cet épiderme débarrassé de son derme, de manière à former une suspension de cellules malpighiennes. La trypsine est peu toxique pour ces cellules épidermiques, car greffées chez l'animal qui les avait fournies, elles sont capables de proliférer pour donner un épiderme sensiblement normal.

En 1956, PERRY et collaborateurs (83) ont montré que « in vitro », grâce à cette méthode de la dissociation des tissus, ils ont pu obtenir des cellules de type épithélial de prolifération active. Les cellules obtenues n'ont cependant pas le même aspect structural que les cellules épidermiques observées en explant, et leur multiplication est plus active. Elles se rapprochent plutôt des cellules HeLa (issues d'un carcinome humain du col utérin) que des cellules malpighiennes.

Ce n'est qu'en 1960 que CRUICKSHANK et collaborateurs ont montré qu'après trypsination de la peau et élimination du derme, les cellules malpighiennes peuvent proliférer en culture « in vitro » tout en conservant l'aspect morphologique non seulement épithélial mais aussi malpighien (10).

De 1957 à 1960, PRUNIERAS, BONJEAN, GATE, CHAR-DONNET et MILLET ont étudié les deux méthodes. Ils ont conclu que la méthode de CRUICKSHANK est reproductible, et ils ont pu étudier les rapports entre les cellules malpighiennes et les mélanocytes : transfert du pigment mélanique par l'intermédiaire des élongations cytoplasmiques, clasmotose, etc... (87, 88, 89, 90).

Une technique a été mise au point au laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon et c'est cette technique que nous allons utiliser (92).

I. — MATÉRIEL

A - Animal d'expérience : cobaye mâle ou femelle.

On utilise seulement la partie postéro-externe de l'oreille.

B - La solution trypsine.

Elle est préparée selon la formule ci-dessous :

NaCl	4 g	}	A
KCl	0,1 g		
Na 2 HPO ₄ , 12H ₂ O	1,45 g		
KH ₂ PO ₄	0,1 g		
Eau bi-distillée	300 cc		
Mg cl ₂ 6H ₂ O	0,05 g	}	B
Eau bi-distillée	200 cc		

On mélange A et B et on ajoute 0,75 g de trypsine (DIFCO) pour avoir une concentration de 0,15 %. On filtre sur membrane de SEITZ, on répartit en flacons de 50 ml et on stocke à moins 20°C. Au moment de l'emploi on décongèle à la température du laboratoire et on ajoute 3 % de sérum, qui sera utilisé pour la mise en culture.

C - Le milieu de culture : milieu de EAGLE.

1) Solution de EARLE concentrée 10 fois (produit Merck) :

Solution A

NaCl	68,0 g
KCl	4,0 g
Na H ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	1,4 g
Glucose	10,0 g
On dissout dans 800 ml d'eau désionisée.	

Solution B

CaCl ₂	2,0 g
MgCl ₂ , 6H ₂ O	1,7 g
On dissout dans 60 ml d'eau désionisée.	

On ajoute la solution A à la solution B. On stérilise par filtration sur millipore. On stocke à + 4°C en flacons de 50 cc.

2) Solution d'acides aminés (produits NBC) pour 100 ml :

L- arginine	0,21 g
L- cystine	0,12 g
L- histidine	0,08 g
L- isoleucine	0,26 g
L- lysine	0,26 g
L- méthionine	0,08 g
L- phénylalanine	0,16 g
L- thréonine	0,24 g
L- tyrosine	0,18 g
L- tryptophane	0,04 g
L- valine	0,24 g

Ces acides aminés sont dissous dans 100 ml d'eau bi-distillée. La dissolution est incomplète et on ajoute 1 ou 3 ml d'HCl concentré (Merck).

La stérilisation se fait par filtration sur filtre millipore par pression. Répartition en flacons de 10 sous volume de 6 ml environ.

On stocke à + 4°C.

3) Solution de vitamines (produits FLUKA) pour 100 ml :

Chlorure de choline	0,01 g
D-biotine	0,01 g
Acide folique	0,01 g
Pantothénate de D- calcium	0,01 g
Nicotinamide	0,01 g
Chlorhydrate de pyridoxine	0,01 g
Chlorhydrate de thiamine	0,01 g
Riboflavine	0,01 g
I - Inositol-méso-inositol	0,04 g

Ces vitamines sont dissoutes l'une après l'autre dans 100 ml d'eau bi-distillée, leur dissolution est assez facile. Pour s'assurer de leur dissolution complète on ajoute 15 gouttes de NaOH à N. La filtration qui suit aussitôt la préparation se fait sur filtre millipore sous pression. La solution est de couleur jaune clair. Répartition en flacons de 10 sous-volume de 6 ml environ. On stocke à — 20°C.

4) Solution de glutamine (NBC) :

L- glutamine 30 g

On dissout dans de l'eau bi-distillée, on stérilise par filtration sur millipore. On répartit en flacon de 10 sous volume de 6 ml environ. On stocke à — 20°C.

5) Solution de Rouge de phénol (MERCK) :

A 0,1 % dans de l'eau bi-distillée. On stérilise par autoclavage. On répartit en flacons de 10 sous volume de 6 ml environ. On stocke la température du laboratoire.

6) Antibiotiques :

Pénicilline (Diamant) - flacon de 1 million U.O. On ajoute 5 ml d'eau bi-distillée stérile. On répartit en tubes maigres sous volume de 0,2 ml. On stocke à — 20°C.

Streptomycine (Diamant) flacon de 1 g. On ajoute 5 ml d'eau bi-distillée stérile, on répartit en petits tubes sous volume de 0,2 ml. On stocke à — 20°C. La concentration finale en antibiotiques du milieu est de 100 U.O. de pénicilline + 50 micro-grammes de streptomycine par millilitre.

7) Solution de NaHCO₃ (MERCK) à 5,6 % :

dans de l'eau bi-distillée. On stérilise par filtration sur millipore on répartit en flacons de 10 ml sous volume de 5 ml environ et on stocke à + 4°C.

8) Sérums : veau, poulain :

Sérum de veau

Animaux âgés de 1 à 3 mois, à jeun depuis la veille. La saignée se fait au trocart à la veine jugulaire. Le sérum peut être obtenu directement dans les tubes à prélèvement :

— soit par centrifugation 24 heures après le prélèvement, après avoir décollé le caillot au bout de 4 à 8 heures ;

— soit par centrifugation 4 à 5 heures après le prélèvement dès le début de la rétraction du caillot.

Il faut faire 2 ou 3 centrifugations à 2.000 tours/minute pendant 20 minutes pour obtenir un sérum convenable.

Sérum de poulain

Prélèvement de sang au trocart dans la veine jugulaire. Exsudation : 24 heures. Centrifugation : 2.000 tours/minute pendant 20 minutes une ou deux fois. La séparation caillot sérum est beaucoup plus facile à obtenir chez le poulain que chez le veau.

Le sérum est filtré sur membrane filtrante de SEITZ. Après répartition, il est stocké à — 20°C. Au moment de l'emploi, le sérum est décongelé à la température du laboratoire, et seulement pour le sérum de veau, inactivé à 56°C pendant 30 minutes.

Pour préparer 50 ml de milieu, on ajoute dans l'ordre :

- 1) 390 ml d'eau bi-distillée stérile (autoclavée ou filtrée).
- 2) 432 ml de solution saline de EARLE (concentrée 10 fois).
- 3) 5 ml d'acides aminés (concentrés 100 fois).
- 4) 5 ml de vitamines (concentrées 100 fois).
- 5) 5 ml de glutamines (concentrées 100 fois).
- 6) 5 ml de rouge de phénol à 0,1 %.
- 7) Antibiotiques : pénicilline à raison de 100 U.O./ml, streptomycine à raison de 50 micro-grammes par ml.

On stocke cette solution à + 4°C (10 jours au maximum) au moment de l'emploi, on ajoute du sérum à la concentration voulue (10 % de sérum de veau inactivé ou 25 % de sérum poulain), puis NaHCO_3 à 5,6 %, 5 à 10 ml pour avoir un pH final 7,2. Ce milieu de culture ne peut être conservé plus de trois jours à 4°C.

II. — LES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

A - Préparation de l'animal (cobaye bicolore)

Les deux oreilles sont lavées à l'eau physiologique puis à l'alcool à 95°. Elles sont ensuite traitées à la mycostatine 24 h avant l'expérience au moins, dans la plupart de nos expériences 48 h avant. Immédiatement après le prélèvement des oreilles on les lave plusieurs fois avec un tampon imprégné d'eau physiologique stérile puis trois fois à l'alcool à 95°.

B - Préparation des milieux

1) Milieu de trypsination

14,55 cc de trypsine P.B.S. + 0,45 cc de sérum poulain ou de sérum veau (3 %) (boîte de Pétri).

2) Milieu de culture (pour une expérience)

7,5 cc de EAGLE + 2,5 cc de sérum poulain (25 %) ou 1 cc de sérum veau (10 %) + bicarbonate de sodium à 5,6 %.

La couleur du milieu doit être de couleur orange. Les milieux doivent être préchauffés à 37°C avant leur utilisation.

C - Prélèvement des fragments de peau

On prélève de très petits fragments de peau sur la face postéro-externe de l'oreille du cobaye au moyen d'un scalpel muni d'une lame chirurgicale Gillette forme B. Une oreille fournit au moins une dizaine de fragments.

D - Trypsination

On met les fragments à flotter dans la solution de trypsine (face épidermique superficielle à l'air). On porte les boîtes de Pétri à l'étuve à 37°C. On laisse agir la trypsine pendant 30 minutes au plus.

E - Préparation de la suspension de cellules

Les fragments sont retirés de la trypsine et placés dans le milieu de culture préchauffé à 37°C, additionné du sérum choisi pour arrêter l'action de la trypsine. On retire un premier frag-

ment et on l'étale en prenant soin de placer la face épidermique sur le support choisi (fond d'une boîte de Pétri). Et maintenant le fragment en place avec une pince fine, on récline le derme, lequel apparaît comme une petite masse blanchâtre dans la goutte du milieu de culture. On râcle alors l'épiderme dans le liquide et un petit nuage blanchâtre se forme. Ce liquide qui contient des cellules épidermiques est aspiré avec une pipette PASTEUR et déposé dans un tube de petit calibre.

On prélève alors un échantillon de la suspension de cellules après une homogénéisation rapide à la pipette PASTEUR et on procède à leur numération à la cellule de BURCKER.

F - Ensemencement

L'ensemencement se fait soit dans des chambres à culture du type décrit par CRUICKSHANK et collaborateurs en 1959 (10), composées de deux faces parallèles transparentes : l'une supérieure est constituée d'une lamelle de verre, l'autre inférieure est formée d'un bloc de plexiglass. En général au bout de 24 heures les cellules s'attachent sur le verre ou sur le plexiglass, selon que le verre est posé en bas ou en haut. Pour ensemer dans les flacons on utilise un inoculum de 5 à 7 millions de cellules pour un flacon du type fiole de pharmacie en verre normalisé de 60 ml ($60 \times 30 \times 15$ mm) en verrerie ordinaire VB (verrerie de Bugey). Les flacons seront bouchés avec des bouchons en polyvinyl.

Les chambres ou les flacons ensemencés sont placés à 37°C. En particulier les flacons contiennent chacun 5 cc de milieu de culture.

N.B. Toutes les manipulations se font stérilement dans une cage à ultra-violet.

G - Technique de repiquage de cellules (selon la méthode de HAYFLICK et MOORHEAD) (32).

Pour 20 ml de diluant ajouter 0,4 cc de trypsine concentrée 50 fois et 0,4 cc de bicarbonate de sodium à 3,92 % + rouge de phénol.

En pratique :

1) chauffer le diluant (incolore) à 37°C pendant 10 minutes ;

2) ajouter ensuite la trypsine (DIFCO) concentrée 50 fois, congelée à -20°C ;

3) prendre une boîte couverte à + + + + ($1 + = 25\%$) nappe continue de cellules :

- vider le milieu
- mettre la trypsine sur la nappe de cellule. Cette quantité de trypsine varié suivant la surface couverte
 - 1 ml pour 1 VN 60
 - 2 ml pour 1 VI
 - 5 à 10 ml pour 1 Roux
- laisser agir pendant 1 minute à la température du laboratoire
- vider ensuite la trypsine
- porter la boîte à l'étuve à 37°C pendant 5 minutes
- la retirer lors du détachement des cellules
- remettre en suspension dans le milieu de croissance :
 - 5 cc dans 1 VN 60
 - 10 cc dans 1 VI.

H - Technique de préparation des chromosomes (selon PRUNIERAS et CHEVALIER : Ann. Inst. Pasteur 1964, 106, 561-574) (91).

1) Culture en tube à lamelles

Les cellules cultivées sur flacons VN 60 sont trypsinées. Après numération les cellules sont réparties par lots de 100.000 cellules en suspension dans 2 ml de milieu de culture. Ces lots sontensemencés dans des tubes à fond plat portant des lamelles 12×32 mm.

2) Mise en colchicine

0,02 ml d'une solution de colchicine à 1/25.000 sont ajoutés à 2 ml de milieu à 24 ou à 4 heures après le repiquage. Il faut utiliser un milieu de croissance et non un milieu de survie. On laisse agir la colchicine de 3 à 5 heures.

3) Traitement des lamelles

a) mode opératoire

— rincer trois fois les lamelles dans les tubes avec environ 2 ml de EARLE ajustée à $\text{pH} = 7$ avec du bicarbonate de

sodium + rouge de phénol à 3,92 %. On décolle les lamelles et on les place dans l'appareil. On fait couler environ 150 ml de EARLE.

— choc hypotonique

On verse dans l'ampoule 400 ml d'eau permutée ajustée à $\text{pH} = 7$ avec la même solution de CO_3NaH + rouge de phénol que l'on fait couler en 20 minutes.

— fixation

On verse dans l'ampoule 100 ml de fixateur ainsi composé :

- 25 ml d'acide acétique MERCK
- 75 ml de méthanol MERCK.

On fait couler au début très lentement jusqu'au virage au jaune de la solution se trouvant dans le récipient contenant les lamelles. On arrête l'écoulement durant 10 minutes puis on remet le fixateur à couler très rapidement. Quand tout est écoulé (environ 20 minutes après l'arrêt) on sort les lamelles et on les met à sécher sur un support à 37°C (durée minimum 24 heures).

4) Coloration

Au GIEMSA (National Aniline Division)

— préparation de la solution mère selon les indications portées sur le flacon de colorant

— préparation de la solution colorante (à préparer extemporanément car elle précipite)

10 ml de solution mère

90 ml d'eau permutée (purifiée en sels minéraux)

1,56 ml de NH_4OH à 0,25 N. pour amener le pH de la solution à 9 environ

— on filtre sur papier WHATMAN n° 2

— 20 à 40 minutes de coloration

— rinçage rapide dans un premier bain d'acétone pour éliminer l'excès de colorant

— passage dans un deuxième bain d'acétone pendant 1 minute

— puis acétone - toluène 2 minutes

— toluène

— montage dans une résine synthétique.

III. — LES RÉSULTATS

Les expériences ont porté sur 21 animaux et nous avons obtenu 13 cultures. Ces 8 échecs sont dus au fait que l'épiderme du cobaye et en particulier celui de l'oreille est normalement contaminé par une flore saprophytique importante, et malgré toutes les précautions d'asepsie prises, la culture est quelquefois souillée en particulier par des levures. D'autre part, dans 4 cas, le sérum employé s'est révélé toxique et a empêché le démarrage des cultures. A ce propos, il est intéressant de noter que des sérums préalablement testés sur des fibroblastes témoins et non toxiques pour ces fibroblastes peuvent parfois être toxiques sur les cellules épidermiques en primo-culture.

Nous avons suivi l'évolution de ces cultures.

A - Aspect des primo-cultures

Les primo-cultures peuvent être examinées soit au petit grossissement et au petit grossissement seulement dans le cas où le récipient choisi est la V.N. 60, soit à tous les grossissements possibles du microscope optique en contraste de phase si les cellules sont mises à cultiver dans une chambre du type CRUICKSHANK. La description détaillée et les relations qui s'établissent entre les différentes cellules étudiées au moyen des chambres à cultures, ont fait l'objet de travaux déjà publiés dans la littérature (PRUNIERAS et collaborateurs : Ann. de Dermatologie) (90).

Le but de notre expérimentation est de savoir si une culture peut être établie avec ou sans irradiation préalable, l'examen en chambre ne devant intervenir que si des modifications grossières directement accessibles à l'examen des flacons de cultures type V.N. 60 sont apparues. Or, comme nous le verrons plus loin, aucune altération évidente n'ayant été observée, l'examen dans les chambres n'a pas été nécessaire. Nous nous bornerons donc à décrire la primo-culture en flacon type V.N. 60.

1) A 24 heures

La paroi du flacon sur laquelle on a laissé sédimenter les cellules est entièrement couverte de cellules rondes. Parmi ces cellules rondes un nombre variable d'éléments se sont attachés au verre, et leur cytoplasme commence à s'étaler.

En changeant de milieu on élimine les cellules rondes qui ne sont pas attachées, c'est-à-dire l'immense majorité, et seules restent sur le verre les cellules qui ont des chances de proliférer.

Selon le type de sérum, l'aspect des cellules est quelque peu différent : globuleux avec le sérum de veau, elles sont plus aplaties et mieux étalées avec le sérum de poulain. Dans un cas comme dans l'autre et à 24 heures, il n'existe pas d'îlot ni de fragment d'épiderme reconnaissable mais seulement un semis de cellules toutes séparées les unes des autres.

Parmi ces cellules, certaines frappent au premier coup d'œil à cause de leur couleur et de leur forme. Il s'agit d'éléments bruns ou noirs, tantôt fusiformes, tantôt hautement dendritiques : ce sont les mélanocytes. Ils sont, en général, beaucoup plus grands et mieux étalés à 24 heures que les cellules malpighiennes. La présence de ces mélanocytes et leur aspect dendritique typique indiquent que la mise en culture a été correctement effectuée et permettent de faire un pronostic très favorable pour l'évolution ultérieure de cette culture. On a pu remarquer, en effet, que si les mélanocytes sont absents à 24 heures, la culture se développe le plus souvent d'une manière chétive et rarement prolongée.

2) De 48 heures à la première subculture

A partir de 48 heures, commencent dans les cas les plus favorables, à se former de petits îlots. Ces îlots sont le résultat des mitoses, lesquelles sont difficilement visibles dans les flacons V.N. 60 à ce stade, mais sont facilement observées en chambre.

Au bout de quelques jours, la surface de verre qui est environ de 30 à 35 cm², se couvre de petites taches blanchâtres directement visibles à l'œil nu. Au microscope optique, ces taches correspondent à des îlots dont le centre est formé de plusieurs couches de cellules superposées et dans la périphérie est constituée par une couche monocellulaire continuellement désagrégée par la ségrégation individuelle des cellules qui tendent à migrer d'une manière centrifuge. Ces cellules migrées vont du reste constituer de nouveaux îlots à distance des premiers.

3) Estimation de la nécessité du repiquage

Pour savoir si un repiquage est nécessaire, on ne peut pas se baser sur la numération des cellules, laquelle est impossible dans les flacons V.N. 60. On se sert alors, d'un signe particulier à l'évo-

lution des îlots de cellules. En effet le centre des îlots étant pluristratifié, il vient un moment où l'empilement des cellules est tel que les cellules situées au centre de la pile subissent une dégénérescence. Elles deviennent d'abord jaune, puis brunissent rapidement en 4 à 5 jours, peuvent si on laisse évoluer les îlots, se constituer en masse noire au centre de ces îlots. Puis cette zone centrale noire se nécrose brusquement et les cellules mortes sont éliminées dans le milieu. L'îlot de cellules se transforme alors en un anneau. Cet îlot ne meurt pas pour autant, car les cellules situées dans cet anneau rampent sur le verre et comblent rapidement la zone centrale dépeuplée. Progressivement un nouvel îlot se forme plus grand, et le même phénomène de nécrose centrale se reproduit.

Si on laisse les cultures évoluer sans les repiquer, on s'aperçoit alors que le nombre d'îlots n'augmente plus et qu'un équilibre s'établit entre les proliférations et les nécroses. Il y a autolimitation de la culture. La première subculture doit donc se situer avant que ne s'institue ce cycle d'autolimitation. Ainsi lorsque les îlots commencent à présenter un jaunissement de leur région centrale il est temps de procéder à la trypsination, laquelle a pour but de redisperser les cellules.

4) Aspect des cultures après le premier repiquage

A partir du premier repiquage, les cellules dispersées ne forment plus des îlots. Au contraire, elles s'étalent et s'organisent en nappes, lesquelles deviennent confluentes en l'espace de 3 à 4 jours nécessitant un nouveau repiquage. Ce nouveau repiquage se fait alors après numération en ensemençant autant de V.N. 60 qu'il y a de fois 500.000 cellules dans le V.N. 60 de la première subculture.

5) Aspect des cultures de la deuxième à la quarantième subculture

Nous avons pu suivre l'évolution de 4 cultures de la deuxième à la quarantième subculture. Les cellules transférées régulièrement tous les 3 à 4 jours par trypsination, sont régulièrement dédoublées au même rythme, de sorte qu'à chaque trypsination un V.N. 60 donne 2 V.N. 60. L'aspect morphologique des nappes cellulaires demeure strictement le même pendant toute la durée de ces 40 subcultures. Il est caractérisé par l'arrangement des

cellules par groupe d'une centaine, chaque groupe pouvant s'inscrire dans un polygone $\pm$ régulier. Chaque cellule prise individuellement ressemble à un fibroblaste. Elle est en effet fusiforme et le noyau ovoïde a son grand axe dans l'axe de la cellule. Autour du noyau existe une couronne de petits grains réfringents très développée quand la culture est entretenue en présence de sérum poulain et très peu développée en présence de sérum de veau.

Cet aspect fibroblastique des cellules prise individuellement, s'oppose à l'arrangement polygonal épithélialoïde de ces cellules lorsqu'elles sont en groupes. Comparé au fibroblaste, cet arrangement polygonal permet une différenciation morphologique très facile parce que les fibroblastes au lieu de s'arranger par groupes polygonaux s'arrangent sur le verre en larges faisceaux parallèles.

B) Reproductibilité de la méthode

Les expériences au cours desquelles il a été possible d'obtenir une culture à la fois du tissu irradié et du tissu normal non irradié seront examinées au chapitre III. Il est à noter, que pour apprécier la capacité de croissance des cellules mises en cultures on a pris pour critère la possibilité de réaliser au moins une subculture. Etant donné que pour obtenir une subculture dans un flacon du type V.N. 60, il est nécessaire d'ensemencer 4 à 500.000 cellules, on peut admettre que l'établissement d'une subculture correspond à une multiplication des cellules attachées sur le verre lors de la mise en culture car le nombre de cellules qui s'attachent dès les premières 24 heures est très largement inférieur à ce nombre.

Cependant un certain nombre de causes étrangères à la technique de mise en culture peuvent empêcher la réalisation d'une subculture : par exemple une pollution survenant pendant les changements de milieu de la primoculture ou encore la toxicité d'un nouveau lot de sérum.

Il s'ensuit que pour juger de la valeur de la méthode en tant que telle, on est en droit de tenir compte de tous les cas où des cellules malpighiennes se sont effectivement attachées au verre et ont donné naissance à des colonies. Sur 21 mises en cultures d'épiderme non irradié effectuées au total on a obtenu 13 primocultures.

Il est donc possible de reproduire en culture près de 2 fois sur 3, ce qui, étant donné la relative difficulté de ce type de culture peut être considéré comme l'indice d'une bonne reproductibilité de la technique. Rappelons en effet à ce propos qu'une difficulté majeure provient du fait que contrairement aux tissus composant les organes internes, lesquels sont protégés des contaminations ambiantes, l'épiderme est l'hôte naturel d'une flore abondante et variée dont il est difficile de se débarrasser pour obtenir une culture stérile.

IV. — CONCLUSION

La méthode de mise en culture des cellules malpighiennes à partir de l'épiderme de cobaye, est décrite en détails. Cette méthode permet d'obtenir une primo-culture dans près de 2 cas sur 3.

Etant donné l'état de contamination permanente du tissu de départ, la reproductibilité de la méthode peut être considérée comme satisfaisante.

De plus les primo-cultures peuvent être subcultivées et les cellules peuvent être entretenues en couche monocellulaire jusqu'à la quarantième subculture et plus après le premier repiquage.

CHAPITRE II

EFFETS CLINIQUES DE L'IRRADIATION AU NIVEAU DES ZONES DESTINÉES AUX PRÉLÈVEMENTS DES ÉCHANTILLONS D'ÉPIDERME A METTRE EN CULTURE

Nous venons de rappeler précédemment les lésions cutanées que provoquent les Rayons X chez l'homme. En ce qui concerne leurs effets sur la peau des animaux, en particulier sur celle des mam-mifères, nous rappellerons surtout les travaux expérimentaux les plus récents :

LACASSAGNE, en 1937, à l'Institut du Radium de Paris, a irradié le flanc d'un lapin avec des Rayons X peu pénétrants (anode de molybdène, aucun filtre, 50 Kv). Il voulait réfuter l'origine virale du cancer en démontrant que l'épiderme irradié du lapin est réfractaire au développement des virus du papillome infectieux de SHOPE. Grâce à cette expérience, LACASSAGNE a pu étudier l'effet de l'irradiation X sur la peau du lapin en administrant des doses croissantes allant de l'épilation à la radio épidermite (7.900 r). Le résultat qu'il obtient n'est pas favorable à l'hypothèse de l'origine infectieuse du cancer (50).

Un auteur suisse, MAGGIORA (Genève) a administré sur le flanc d'un cobaye 1.600 r en une seule fois, et il a montré que la peau du cobaye « se souvient » d'une irradiation antérieure s'il reçoit une irradiation identique deux mois plus tard (68).

AFRIKANOVA a fait des expériences chez le chat, le rat, la souris. Elle a montré que des doses de 5.000 r provoquent des modifications de la peau. Le processus de réparation est long, et n'aboutit pas à une cicatrisation complète (3).

MELLETT et collaborateurs ont mené une expérimentation sur 22 cobayes albinos qui reçoivent 6.000 r en une fois. Ils ont montré que survenaient des lésions en deux phases successives (ulcérations-nécrose) après une irradiation locale de la peau du cobaye par les Rayons (73).

Comme MELLETT et collaborateurs, nous avons pris comme animal d'expérience, le cobaye, mais nous avons travaillé seulement sur les oreilles (la surface postéro-externe de l'oreille). L'intérêt du choix de l'oreille réside dans le fait que c'est une région recouverte seulement d'un duvet, nous évitant ainsi l'inconvénient majeur de la présence des poils. Nous avons irradié en tout, une population de 28 cobayes bicolores et nous avons pratiqué notre irradiation en deux séries d'expériences correspondant à l'utilisation de deux types d'appareils producteurs de Rayons X :

— appareil de radiologie classique (C.G.R.) pour radiothérapie superficielle,

— appareil de contactthérapie PHILIPS.

a) **Première série d'expériences** : radiothérapie conventionnelle.

Une série de 4 cobayes correspondant à l'irradiation de 8 oreilles qui ont reçu chacune en une seule fois des doses croissantes (de 50 r en 50 r) allant de 200 r à 600 r.

b) **Deuxième série d'expériences** : contactthérapie PHILIPS.

Une série de 23 cobayes a été utilisée : les oreilles de chaque animal ont reçu deux par deux des doses croissantes de 1.200 r à 9.500 r en une seule fois.

Nous avons ensuite observé ces animaux afin d'étudier les effets cliniques de l'irradiation. Après quelques jours d'observations, nous avons pratiqué des biopsies sur une oreille, pour étude histologique, la deuxième oreille du même animal qui avait reçu la même dose de Rayons X est laissée intacte et conservée comme témoin clinique.

I. — LES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

A - Immobilisation de l'animal.

C'est une phase très importante, car si l'animal bouge, la dose administrée n'est plus la même par variation de la distance tube producteur de Rayons X - peau. Nous avons utilisé une petite caisse en bois parallélépipédique comportant sur une de ces faces une guillotine mobile. La nuque de l'animal est immobilisée dans la guillotine. Par ailleurs, pour empêcher les ruades, nous avons coincé le corps de l'animal entre des boîtes en carton. Une chape de plomb protège la tête contre les rayons, excepté l'oreille à irradier qui reste à découvert par l'intermédiaire d'un trou de 3 cm de diamètre découpé dans la chape de plomb. Cette chape de plomb est aussi un facteur d'immobilisation : en effet elle est fixée fortement sur la guillotine empêchant l'animal de bouger ou de relever la tête. Pendant toute la durée de l'expérience notre système d'immobilisation ne gêne nullement l'animal dans sa respiration. Par ailleurs, afin de se mettre dans les mêmes conditions que dans le chapitre I nous avons enduit de pommade à la mycosatine les oreilles de chaque cobaye.

B - Les caractéristiques de l'irradiation.

1) Données générales.

En électro-radiologie on caractérise le rayonnement X par :

- la tension d'émission exprimée en Kv appliquée aux bornes du tube
- l'intensité qui traverse le filament du tube exprimée en milliampère (mA) conditionnant de façon directement proportionnel le flux de Rayons X
- la filtration
- le temps d'irradiation
- la distance foyer-peau
- le débit en Roentgen/minute (r/minute).

Le rayonnement X obtenu est constitué par des radiations molles ou peu pénétrantes de grandes longueurs d'onde et des radiations dures pénétrantes avec entre ces deux extrêmes des radiations intermédiaires.

$$0,06 \text{ A} < \lambda < 1.000 \text{ A}$$

Dans toutes nos expériences, nous avons utilisé des radiations peu pénétrantes, molles de grandes longueurs d'onde.

2) Les appareils utilisés :

- appareil de radiologie classique (C.G.R.) utilisé pour la radiothérapie superficielle
- appareil de contactthérapie PHILIPS.

3) Les caractéristiques de l'irradiation :

a) **Première expérience :** radiothérapie conventionnelle avec un appareil de radiologie classique.

Le rayonnement est émis sous :

- une tension de 100 Kv
- une intensité de 12 mA
- feu nu (sans filtre)
- distance foyer-peau 50 cm
- un débit de 25 r/minute
- une dose totale d'irradiation aiguë en une seule fois de 200 r à 600 r (intervalle entre les doses 50 r) sur chaque oreille.

b) **Deuxième expérience :** contactthérapie PHILIPS.

Le rayonnement est émis sous :

- une tension de 50 Kv
- une intensité 2 mA
- filtre I Al
- distance foyer-peau 4 cm (de 1.200 r à 3.000 r) et 2 cm (de 3.500 r à 9.500 r)
- débit 840 r/minute (distance foyer-peau 4 cm) et 3.420 r/minute (distance foyer-peau 2 cm)
- dose totale d'irradiation aiguë en une seule fois sur les deux oreilles de 1.200 r à 9.500 r.

II. — LES RÉSULTATS

A - **Première expérience :** irradiation par appareil de radiologie classique.

Nous avons suivi l'évolution clinique de ces animaux pendant un an. Les résultats que nous avons obtenus sont négatifs. Les

rayons X apparemment aux doses ci-dessus, ne provoquent aucun effet clinique chez le cobaye. Pas d'épilation ni érythème.

— Discussion.

Il est intéressant ici de signaler que la dose d'érythème chez l'homme, à peu près dans les mêmes conditions d'irradiation, c'est-à-dire rayons X mous 120 Kv 1 A1 est de 600 r administrée en moins d'une semaine.

La question qui se pose alors est de savoir pourquoi cette différence de radio-sensibilité est si grande entre l'homme et le cobaye.

En toute évidence on peut envisager que la race joue un rôle rôle déterminant. Par ailleurs le matériel sur lequel nous travaillons présente un fin duvet. D'après VENKATESWARLY et collaborateur, il existe une diffraction des Rayons X par les poils et les plumes. Ils ont travaillé sur plusieurs mammifères dont le buffle. Ils ont constaté que le poil de buffle est caractérisé par la présence de six anneaux de DEBYE-SCHERRER en plus du diagramme habituel d' α -kératine. L'étude chromatographique montre un nouvel acide aminé. Ce phénomène de diffraction disparaît si on traite les poils par les acides acétique et formique (108).

On comprend, par conséquent, qu'en raison de cette diffraction, l'irradiation d'animaux à fourrures non rasées ait besoin d'être poussée beaucoup plus loin pour donner des lésions. Il est alors surprenant de constater qu'au niveau de l'oreille du cobaye qui ne porte pas de fourrures mais un fin duvet grossièrement comparable au duvet de l'homme, la dose de 600 r soit sans effet. Nous pouvons déduire que les Rayons X n'ont apparemment aucun effet clinique visible dans l'intervalle des doses 200 r à 600 r, et que la peau du cobaye est moins radio-sensible que l'épiderme humain.

B - Deuxième expérience : contactthérapie.

1) Evolution clinique

Nous avons administré des doses croissantes de Rayons X allant de 1.200 r à 9.500 r à une population de 23 cobayes bicolores, une même dose est appliquée en une seule fois sur chaque oreille d'un même animal. Nous avons suivi l'évolution clinique

pendant quatre mois (cf. tableau ci-dessous). Grâce à ce tableau nous pouvons distinguer les trois formes classiques de radio-lésions cutanées.

a) L'érythème

Il est survenu dans toutes nos expériences avec une latence plus ou moins grande suivant les doses.

A la dose de 1.200 r par exemple, l'érythème est le seul symptôme cutané. On observe une petite desquamation. L'épilation est très discrète.

Aux doses plus élevées l'érythème précède l'apparition des lésions cutanées. Il y a un trouble fonctionnel de la circulation cutanée : les vaisseaux sont dilatés et la circulation de retour semble être nettement ralentie.

Nous retrouvons ici les observations de HEITE, MACHER, 1961, chez le cobaye après une irradiation aux Rayons X de la peau. Au moyen d'injection à l'encre de Chine ils ont montré une diminution du nombre des vaisseaux se manifestant cliniquement vers le vingt-troisième jour, très marquée le quarante-huitième jour (33).

MORDINOVA rapporte ses observations sur 50 malades en cours de radiothérapie pour cancer ou présentant des radiodermites : les modifications de la perméabilité vasculaire précèdent l'apparition des lésions cutanées. Il y a une altération de la fonction du tissu conjonctif contemporain de ces lésions (77).

Nous retrouvons ce trouble fonctionnel vasculaire chez tous nos cobayes sauf à 1.200 r où il est très discret.

b) La radionécrose aiguë diffuse

Les lésions surviennent avec une latence plus ou moins grande : après le trente-neuvième jour à 1.600 r et au quinzième jour à 9.500 r. Elles sont plus ou moins graves aussi en fonction de la dose : à 1.600 r nous avons une petite ulcération de l'oreille gauche en voie de cicatrisation : radiodermite du premier degré ; à 2.800 r nous avons une radiodermite du deuxième degré et même du troisième degré avec atteinte de tous les éléments du tégument. Le derme est mis à nu, douloureux au moindre attouchement. Cette ulcération est suivie de la formation d'une croûte épaisse, ostrécée, et la cicatrisation se fait très bien, engendrant

TABLEAU I

Deuxième expérience : Contactthérapie : évolution clinique des radiolésions cutanées

LES EFFETS DE L'IRRADIATION

	COBAYE 1 1.200 r 11.8.65	COBAYE 2 1.400 r 11.8.65	COBAYE 3 1.600 r 11.8.65	COBAYE 4 1.800 r 11.8.65	COBAYE 5 2.000 r 11.8.65	COBAYE 6 2.200 r 11.8.65	COBAYE 7 2.400 r 11.8.65	COBAYE 8 2.600 r 17.8.65	COBAYE 9 2.800 r 17.8.65	COBAYE 10 3.000 r 17.8.65	COBAYE 11 3.500 r 18.8.65	COBAYE 12 4.000 r 18.8.65	COBAYE 13 4.500 r 18.8.65	COBAYE 14 5.000 r 19.8.65	COBAYE 15 5.500 r 19.8.65	COBAYE 16 6.000 r 19.8.65	COBAYE 17 6.500 r 19.8.65	COBAYE 18 7.000 r 19.8.65	COBAYE 19 7.500 r 19.8.65	COBAYE 20 8.000 r 19.8.65	COBAYE 21 8.500 r 19.8.65	COBAYE 22 9.000 r 19.8.65	COBAYE 23 9.500 r 19.8.65	
Sexe	♂	♀	♀	♀	♂	♀	♀	♀	♂	♀	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♂	♂	♀	♂	♀	♀	
Description	Pelage : noir blanc, jaune Yeux : roses Oreilles : brunes	Pelage : noir, blanc, jaune Yeux : noirs Oreilles : brunes	Pelage : noir, blanc, jaune Yeux : noirs Oreilles : brunes	Pelage : noir, blanc Yeux : noirs Oreilles : roses	Pelage : noir, jaune Yeux : noirs Oreilles : brunes	Pelage : noir, blanc, jaune Yeux : noirs Oreilles : OG : noir OD : rose	Pelage : blanc, jaune Yeux : noirs Oreilles : OG : rose OD : brune	Pelage : noir, blanc, jaune Yeux : noirs Oreilles : OD : rose OG : noire	Pelage : blanc, jaune Yeux : noirs Oreilles : roses	Pelage : blanc, jaune Yeux : noirs Oreilles : brunes	Pelage : noir, blanc, jaune Yeux : noirs Oreilles : brunes	Pelage : noir, blanc, jaune Yeux : noirs Oreilles : brunes	Pelage : noir, blanc, jaune Yeux : noirs Oreilles : OD : noire OG : noire et rose	Pelage : noir, blanc, jaune Yeux : noirs Oreilles : brunes	Pelage : blanc, jaune Yeux : noirs Oreilles : roses	Pelage : noir, blanc jaune Yeux : noirs Oreilles : brunes	Pelage : noir, blanc, jaune Yeux : noirs Oreilles : brunes	Pelage : noir, blanc, jaune Yeux : roses Oreilles : brunes	Pelage : noir, blanc, jaune Yeux : roses Oreilles : brunes	Pelage : blanc, jaune Yeux : noirs Oreilles : roses	Pelage : noir, blanc jaune Yeux : noirs Oreilles : brunes	Pelage : blanc, jaune Yeux : roses Oreilles : brunes		
	Poids : 310 g	Poids : 350 g	Poids : 320 g	Poids : 340 g	Poids : 320 g	Poids : 280 g	Poids : 310 g	Poids : 380 g	Poids : 290 g	Poids : 350 g	Poids : 350 g	Poids : 340 g	Poids : 350 g	Poids : 400 g	Poids : 390 g	Poids : 420 g	Poids : 310 g	Poids : 380 g	Poids : 390 g	Poids : 350 g	Poids : 320 g	Poids : 360 g	Poids : 340 g	
				4 ^e jour : Réseau vasculaire visible	4 ^e jour : Erythème réseau vasculaire visible		3 ^e jour : Erythème				3 ^e jour : Erythème	3 ^e jour : Erythème		4 ^e jour : Réseau vasculaire visible, érythème				3 ^e jour : Erythème bilatéral, réseau vasculaire visible	4 ^e jour : Epilation discrète	3 ^e jour : Erythème	5 ^e jour : Erythème réseau vasculaire visible	5 ^e jour : Erythème de la partie post. de l'oreille droite	5 ^e jour : Erythème, épilation discrète	
		17 ^e jour : Mort de l'animal Aucune modification clinique	6 ^e jour : Erythème discret Réseau vasculaire visible			9 ^e jour : Erythème réseau vasculaire visible		6 ^e jour : Réseau vasculaire visible, érythème		7 ^e jour : Erythème		7 ^e jour : Début d'épilation	10 ^e jour : Epilation discrète, réseau vasculaire visible	14 ^e jour : Epilation discrète				6 ^e jour : Epilation, réseau vasculaire visible	6 ^e jour : Epidermite	6 ^e jour : Epilation nette à gauche et à droite	15 ^e jour : Epilation totale de l'occiput, petite ulcération à gauche	15 ^e jour : Petite ulcération à la base de l'oreille droite	15 ^e jour : Ulcération de l'oreille droite	
				27 ^e jour : Epidermite sèche discrète épilation	24 ^e jour : Epilation et ulcération avec croûte noirâtre à la base de l'oreille	22 ^e jour : Epilation		18 ^e jour : Epidermite sèche, épilation, desquamation	18 ^e jour : Epidermite sèche, épilation, desquamation	26 ^e jour : Epilation, ulcération bilatérale des oreilles cicatrisées le 22.9	28 ^e jour : Début d'épilation, epidermite à droite	28 ^e jour : Epidermite sèche bilatérale des deux oreilles, Epilation, Cicatrisation le 22.9.65	28 ^e jour : Epidermite sèche bilatérale des deux oreilles, Epilation, Cicatrisation le 22.9.65	27 ^e jour : Epilation	27 ^e jour : Epilation	27 ^e jour : Epidermite sèche, croûteuse* à la partie post. Irrad. des deux côtés	28 ^e jour : Ulcération de l'oreille droite et de la partie antérieure correspondante	28 ^e jour : Ulcération de l'oreille droite sur les parties inter. et exter.	19 ^e jour : Ulcération croûteuse de l'oreille droite	19 ^e jour : Ulcération oreille droite hyperplasie avec œdème des replis, ulcération à gauche	23 ^e jour : Cicatrisation	28 ^e jour : Nouvelles ulcérations étendues à gauche	28 ^e jour : Apparition de nouvelles ulcérations à gauche	28 ^e jour : Nécrose
			29 ^e jour : Epilation		29 ^e jour : Mort de l'animal		29 ^e jour : Epilation	31 ^e jour : Epidermite sèche des deux oreilles, nouvelle ulcération suintante	31 ^e jour : Cicatrisation, l'épiderme se reforme progressivement	31 ^e jour : Mort de l'animal, épilation complète de la région de la nuque, rétraction de l'oreille au niveau de l'ulcération	31 ^e jour : Mort de l'animal, épilation complète de la région de la nuque, rétraction de l'oreille au niveau de l'ulcération	32 ^e jour : Cicatrisation avec d'épilation	32 ^e jour : Cicatrisation avec d'épilation	29 ^e jour : Epilation, ulcération de la partie postérieure de l'oreille droite et de la partie antérieure correspondante	29 ^e jour : Epilation, ulcération de la partie postérieure de l'oreille droite et de la partie antérieure correspondante	29 ^e jour : Epilation, ulcération de la partie postérieure de l'oreille droite et de la partie antérieure correspondante	29 ^e jour : Epilation, ulcération de la partie postérieure de l'oreille droite et de la partie antérieure correspondante	29 ^e jour : Epilation, ulcération de la partie postérieure de l'oreille droite et de la partie antérieure correspondante	29 ^e jour : Epilation, ulcération de la partie postérieure de l'oreille droite et de la partie antérieure correspondante	29 ^e jour : Epilation, ulcération de la partie postérieure de l'oreille droite et de la partie antérieure correspondante	29 ^e jour : Epilation, ulcération de la partie postérieure de l'oreille droite et de la partie antérieure correspondante	29 ^e jour : Epilation, ulcération de la partie postérieure de l'oreille droite et de la partie antérieure correspondante		
	35 ^e jour : Epidermite légère Epilation discrète	35 ^e jour : Epidermite sèche épilation	35 ^e jour : Epidermite sèche épilation			35 ^e jour : Epidermite sèche, pas d'ulcération	37 ^e jour : Epidermite ulcération discrète, cicatrisation le 22.9.65	49 ^e jour : Epilation définitive, cicatrisation	49 ^e jour : Apparition de nouvelles ulcérations sur les cicatrices	55 ^e jour : Atrophie complète de l'oreille	39 ^e jour : Apparition de nouvelles ulcérations des deux oreilles	55 ^e jour : Cicatrisation	43 ^e jour : Ulcération bilatérale au deux oreilles	48 ^e jour : Cicatrisation		38 ^e jour : Ulcération bilatérale des deux oreilles, hyperplasie croûteuse correspondante de la partie externe correspondante			36 ^e jour : Apparition de nouvelles ulcérations à gauche	35 ^e jour : Nécrose complète de l'oreille	35 ^e jour : Nécrose		30 ^e jour : Nécrose	

une oreille modifiée sur son bord libre avec accentuation et induration des plis internes de l'oreille. La surface totale diminue par rétraction et la peau reste le plus souvent parcheminée, fragile.

c) La nécrose totale

Elle survient après une phase de cicatrisation plus ou moins brève de l'ulcération. L'intervalle entre ce stade et le stade précédent diminue avec les doses. Elle est de 21 jours environ jusqu'à 7.500 r et de 13 jours à 9.500 r. Cette évolution en deux phases des lésions de la peau du cobaye après une irradiation locale par les Rayons X a été déjà observée en 1960 par MELLETT et collaborateurs, mais dans un cas particulier chez 22 cobayes albinos qui ont reçu 6.000 r en une fois. La première phase de l'ulcération commence au dix-huitième jour suivie ensuite par une nécrose des tissus profonds (73).

Pour AFRIKANOVA les doses de 5.000 r provoquent des modifications dans tous les composants de la peau chez le chat, le rat et la souris (3). Le processus de réparation est long. Il y a persistance d'une ulcération qui secondairement donnera une nécrose.

Pour appuyer nos observations cliniques nous avons fait des biopsies sur une oreille aux différents stades de son évolution clinique, en laissant une oreille intacte comme témoin clinique évolutif afin d'étayer nos arguments sur des bases histologiques solides.

2) Histologie

Biopsie I : cobaye n° 3, 1.600 r l'oreille gauche a été prélevée.

Commentaire : il existe une ulcération superficielle intéressant l'épiderme d'un seul côté. La pigmentation est extrêmement importante de part et d'autre de l'ulcération. L'ulcération elle-même est recouverte d'une croûte fibrino-leucocytaire. Le derme est le siège d'une réaction proliférative du type granulome cicatriciel et des vaisseaux du derme moyen ont une paroi épaisse. Le cartilage est normal. A l'opposé de l'ulcération, l'épiderme de l'autre côté est aminci, réduit à une ou deux couches de cellules plus ou moins décollées du derme et très pigmentées.

Biopsie II : cobaye n° 9, 2.800 r (prélèvement oreille droite).

Commentaire : les lésions sont du même ordre qu'à 1.600 r mais légèrement plus intense car l'épiderme opposé à la zone irradiée est nécrosé.

Biopsie III : cobaye n° 15, 5.500 r (prélèvement de l'oreille gauche).

Commentaire : il existe une vaste ulcération siégeant de part et d'autre d'un cartilage peu modifié. L'ulcération intéresse l'épiderme et le derme superficiel. La couche musculaire est désorganisée, les artérioles ont des parois épaissies. Il existe un certain nombre de dilatations vasculaires du type angioïde.

Biopsie IV : cobaye n° 16, 6.000 r (prélèvement de l'oreille gauche).

Commentaire : l'ulcération est plus importante qu'à 5.500 r. Les lésions sont du même ordre.

Biopsie V : cobaye n° 20, 8.000 r (prélèvement de l'oreille gauche).

Commentaire : ulcération portant à la fois sur la face externe et interne, il y a un épaississement de l'épiderme en bordure de l'ulcération, laquelle est recouverte d'une croûte fibrino-leucocytaire. Au bord de l'ulcération existe une augmentation de la pigmentation du derme superficiel. Cette réaction pigmentaire disparaît presque complètement au niveau de l'ulcération. En dessous, nous avons une désorganisation de la couche musculaire, une vaso-dilatation et épaississement des parois des vaisseaux du derme moyen. Le cartilage, déformé à l'aplomb de l'ulcération, n'est pas détruit.

Biopsie VI : cobaye n° 23, 9.500 r (prélèvement de l'oreille droite).

Commentaire : il existe une ulcération de part et d'autre du cartilage qui est légèrement hypertrophique par prolifération d'éléments histiocytaires indifférenciés. Le derme de part et d'autre du cartilage est infiltré de cellules inflammatoires et de

polynucléaires. L'infiltration inflammatoire envahit complètement le tissu conjonctif de part et d'autre du cartilage au niveau de l'ulcération, laquelle intéresse l'épiderme et le derme superficiel. Les lésions vasculaires sont intenses avec image d'oblitération. La pigmentation du derme superficiel est nettement augmentée au pourtour de l'ulcération.

III. — CONCLUSION

La nature des lésions cliniques et histologiques observées dans la peau de cobaye après irradiation par les Rayons X n'est pas différente de celles qui sont connues dans la peau humaine.

Mais les premières lésions n'apparaissent qu'après une irradiation minimum de 1.600 r. La résistance de la peau de cobaye à l'irradiation par les rayons X est donc très supérieure à celle de la peau humaine.

Le rôle de la pommade à la mycostatine qui ne contient pas de corps filtrant n'a apparemment pas de raison d'être incriminé.

CHAPITRE III

ÉTUDE DU POUVOIR DE POUSSE EN CULTURE DE L'ÉPIDERME IRRADIÉ ET NON IRRADIÉ PRÉLEVÉ SUR LE MÊME ANIMAL

Nous avons étudié dans les chapitres précédents :

1 - La méthode de mise en culture de l'épiderme de cobaye normal,

2 - Les effets cliniques de l'irradiation au niveau des zones destinées au prélèvement des échantillons d'épiderme à mettre en culture, en l'occurrence la partie postéro-externe des oreilles.

Nous avons combiné ces deux méthodes pour étudier la capacité de multiplication et les caractéristiques de croissance des cellules épidermiques « in vitro » après une irradiation préalable des oreilles « in vivo ».

L'étude des différents aspects de ce problème présente actuellement un grand intérêt pratique, car si on connaît très bien les effets des Rayons X « in vitro » il semble qu'on ait peu de renseignements sur la résistance réelle aux radiations des cellules « in vivo » (à l'exception des cellules du sang et de la moelle) et le comportement ultérieur de ces cellules en culture « in vitro ».

I. — PROTOCOLE

Il s'agit de mettre en culture, dans une seule séance (1 heure environ après l'irradiation), l'épiderme de l'oreille irradiée et celui de l'oreille témoin, d'observer ensuite s'il existe des différences.

II. — LES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Elles sont strictement les mêmes que dans les chapitres I et II.

III. — LES RÉSULTATS

Les expériences ont porté sur 21 animaux. Les irradiations ont été pratiquées avec un appareil de radiothérapie conventionnel et les doses administrées s'étalent de 200 r à 1.200 r. Les résultats de ces 21 expériences sont consignés dans les tableaux ci-dessous :

Le premier tableau concerne les résultats obtenus dans la mise en culture des oreilles irradiées.

Le deuxième tableau concerne les résultats obtenus dans la mise en culture de l'oreille témoin du même animal.

- la première colonne indique le numéro de l'expérience ;
- la deuxième colonne indique le sexe ;
- la troisième colonne indique la dose ;
- la quatrième colonne indique par le signe + si une subculture a été possible. Cette subculture est utilisée comme critère pour définir la capacité de croissance des cellules explantées. Il a pu arriver que des cellules mises en culture aient proliféré, mais si la prolifération obtenue s'est révélée insuffisante pour permettre une subculture, le résultat est considéré comme négatif ;
- la cinquième colonne indique le nombre de jours qui se sont écoulés entre la mise en culture et la première subculture ;
- la sixième colonne indique les observations faites au cours des expériences.

Il ressort de l'examen comparé de ces deux tableaux que sur 21 mises en culture après l'irradiation, la subculture a été possible 11 fois. En comparaison, la mise en culture du tissu épidermique témoin a donné une subculture 13 fois sur 21.

Si l'on considère les cas où la culture a échoué pour des raisons indépendantes de l'irradiation, on trouve l'expérience 8, victime d'une souillure, et les expériences 11, 12, 13 et 14 dont les résultats mauvais sont dus au caractère toxique du sérum utilisé.

Il ressort que pour les tissus épidermiques irradiés, le nombre d'expériences valables est réduit à 16 et que sur 16 cas, 11 cultures ont été suffisantes pour permettre au moins une subculture.

En ce qui concerne la mise en culture des cellules épidermiques non irradiées témoins, les expériences 11, 12, 13, 14 ont subi le même sort que les expériences après irradiation en raison de l'emploi du même sérum toxique. Le nombre d'expériences valables est ainsi ramené à 17 sur lesquelles 13 cultures se sont développées suffisamment pour permettre au moins une subculture.

Si l'on ne tient pas compte de l'expérience 8 souillée pour le tissu irradié mais non souillée pour le tissu témoin, on s'aperçoit que pour 16 expériences permettant une comparaison significative le tissu irradié a donné 11 cultures et le tissu non irradié en a donné 12.

Si l'on considère maintenant la dose d'irradiation, on s'aperçoit que l'administration de 200 r se révèle sans effet. Il en est de même des doses de 600 r et de 800 r. Au-dessus de 800 r, on note qu'à 1.200 r la mise en culture du tissu irradié est toujours possible.

En ce qui concerne les délais entre la date de la mise en culture et celle de la première subculture, on note qu'ils vont de 8 à 19 jours pour le tissu irradié et de 4 à 12 jours pour les tissus témoins sauf dans le cas de l'expérience 1 où ce délai s'est élevé à 47 jours. Cependant, ce délai tardif de 47 jours trouve son explication dans une légère faute de manipulation (surchauffe du milieu de culture).

Il semble qu'on puisse déduire de cette comparaison que la première subculture du tissu irradié se situe un peu plus tardivement que dans le cas du tissu témoin.

En ce qui concerne le sexe pour 15 femelles et 6 mâles, aucune influence ne paraît devoir être retenue étant donné que les cultures positives ont été obtenues 8 fois sur 15 et 3 fois sur 6.

TABLEAU II

Mise en culture de l'épiderme de l'oreille irradiée

Exp. N°	Sexe	Dose irradia.	Date culture	Subculture	Délai première subculture	Observations
1	Fem.	200 r	14.1.65	+	10 ^e jour	Nombreux mélanocytes dendritiques.
2	Mâle	200 r	21.1.65	—	—	Pas de cellules attachées.
3	Fem.	200 r	28.1.65	—	—	Pas de cellules attachées.
4	Fem.	1 000 r	4.2.65	+	18 ^e jour	Présence de mélanocytes dendritiques au 6 ^e jour.
5	Mâle	200 r	18.2.65	+	8 ^e jour	Nombreux mélanocytes dendritiques à 24 heures.
6	Fem.	600 r	15.4.65	+	12 ^e jour	Nombreux mélanocytes dendritiques très pigmentés au 3 ^e jour.
7	Mâle	800 r	29.4.65	+	10 ^e jour	Nombreux mélanocytes sombres au 2 ^e jour.
8	Fem.	1 000 r	6.5.65	—	—	Souillure.
9	Fem.	1 200 r	12.5.65	—	—	Mélanocytes dendritiques nombreux.
10	Fem.	800 r	19.5.65	+	8 ^e jour	Mélanocytes nombreux.
11	Fem.	1 000 r	26.5.65	—	—	Utilisation d'un sérum qui s'est avéré toxique.
12	Fem.	800 r	31.5.65	—	—	Utilisation d'un sérum qui s'est avéré toxique.
13	Fem.	800 r	4.6.65	—	—	Utilisation d'un sérum qui s'est avéré toxique.
14	Mâle	800 r	9.6.65	—	—	Utilisation d'un sérum qui s'est avéré toxique.
15	Mâle	800 r	21.6.65	+	9 ^e jour	Mélanocytes dendritiques nombreux.
16	Fem.	800 r	23.6.65	+	14 ^e jour	Très beaux mélanocytes sombres après le 2 ^e jour.
17	Fem.	800 r	24.6.65	—	—	Pas de cellules attachées.
18	Fem.	800 r	12.7.65	+	17 ^e jour	Mélanocytes nombreux après le 6 ^e jour.
19	Fem.	1 200 r	26.7.65	+	18 ^e jour	Trypsination de nécessité , l'étalement des îlots se fait très difficilement. Beaucoup de mélanocytes dendritiques.
20	Mâle	1 000 r	28.7.65	—	—	Pas de cellules attachées.
21	Fem.	1 200 r	30.7.65	+	19 ^e jour	Beaucoup de mélanocytes, l'étalement des îlots est difficile.

Mise en culture de l'épiderme de l'oreille témoin

Exp. N°	Sexe	Date culture	Subculture	Délai première subculture	Observations
1	Fem.	14.1.65	+	47 ^e jour	Pousse très lente, Cellules en très mauvais état (faute opératoire : surchauffe du milieu de culture).
2	Mâle	21.1.65	—	—	Flacon détruit. Pas de cellules attachées sur le verre.
3	Fem.	28.1.65	—	—	Pas de cellules attachées sur le verre.
4	Fem.	4.2.65	+	10 ^e jour	Mélanocytes peu dendritiques au 3 ^e jour.
5	Mâle	18.2.65	+	7 ^e jour	Présence de mélanocytes après 48 heures.
6	Fem.	15.4.65	+	12 ^e jour	Mélanocytes au 3 ^e jour.
7	Mâle	29.4.65	+	8 ^e jour	Présence de quelques mélanocytes à 48 heures.
8	Fem.	6.5.65	+	6 ^e jour	Mélanocytes.
9	Fem.	12.5.65	—	—	Mauvais témoin : quelques floots de cellules : utilisation de sérum toxique.
10	Fem.	19.5.65	+	12 ^e jour	Présence de mélanocytes.
11	Fem.	26.5.65	—	—	Utilisation d'un sérum qui s'est avéré toxique.
12	Fem.	31.5.65	—	—	Utilisation d'un sérum qui s'est avéré toxique.
13	Fem.	4.6.65	—	—	Utilisation d'un sérum qui s'est avéré toxique.
14	Mâle	9.6.65	—	—	Utilisation d'un sérum qui s'est avéré toxique.
15	Mâle	21.6.65	+	4 ^e jour	Présence de mélanocytes.
16	Fem.	23.6.65	+	7 ^e jour	Présence de mélanocytes.
17	Fem.	24.6.65	—	—	Les cellules ne sont pas attachées, pas de mélanocytes.
18	Fem.	12.7.65	+	8 ^e jour	Mélanocytes au 3 ^e jour.
19	Fem.	26.7.65	+	4 ^e jour	Mélanocytes au 3 ^e jour.
20	Mâle	28.7.65	+	5 ^e jour	Mélanocytes peu dendritiques.
21	Fem.	30.7.65	+	7 ^e jour	Mélanocytes d'aspect dendritique.

Dans la colonne des observations, on note que dans le cas des cultures actives, à partir du tissu irradié, il est fréquemment porté la mention « nombreux mélanocytes dendritiques ». Si l'on compare avec le tissu témoin, on s'aperçoit que la présence des mélanocytes n'est pas due à l'irradiation, car ceux-ci existent aussi bien dans les cultures témoins. Toutefois, le nombre des mélanocytes et surtout leur aspect hautement dendritique méritent d'être soulignés dans les cultures de tissu irradié.

La taille des dendrites et le nombre d'embranchements dendritiques étant considérés classiquement comme un signe d'activité il peut être admis que l'irradiation activerait dans une certaine mesure les mélanocytes.

Commentaires :

Notre expérience de mise en culture du tissu irradié a été conduite avec des doses allant de 200 r à 1.200 r. Etant donné, comme on l'a vu lors de l'étude clinique des irradiations, que jusqu'à 1.200 r l'irradiation semble demeurer sans effet, il ne nous est pas possible d'établir une correspondance entre l'effet clinique de l'irradiation et son effet biologique estimé par la mise en culture.

Par contre, si l'on se réfère aux travaux de PUCK et MARCUS sur l'effet de l'irradiation des cultures « in vitro », on sait que l'effet de l'irradiation est proportionnel à la dose et que pour des valeurs de 1.200 r, les cultures sont complètement inhibées, en particulier, les mitoses sont arrêtées et les cellules subissent des modifications morphologiques profondes (98).

Les résultats de notre expérience semblent, par conséquent, démontrer que pour des doses d'irradiations comparables, les cellules « in vivo » sont infiniment plus résistantes que les cellules en culture « in vitro ».

On peut discuter ce fait en considérant que cette résistance peut n'être qu'apparente.

En effet, les cellules qui à partir de l'épiderme ont des chances de se multiplier en culture, sont celles de la couche basale mitogène. Or, ces cellules sont les plus profondément situées, si elles se révèlent capables de se multiplier « in vitro », même après une irradiation de 1.200 r sur l'épiderme, ceci signifie vraisemblable-

ment que les couches épidermiques situées au-dessus d'elles forment un écran protecteur tel que la dose d'irradiation qui les atteint finalement, est très largement inférieure à la dose totale administrée.

En ce qui concerne l'efficacité de la protection, ainsi assurée par les couches superficielles de l'épiderme, rien dans notre expérience ne permet de définir avec précision son degré. Cependant on remarque d'une part un allongement sensible du délai d'apparition des subcultures, ce qui semble indiquer que les cellules du tissu irradié qui se multiplient « in vitro », ne sont pas exactement semblables aux cellules témoins, et d'autre part que l'activité augmentée des mélanocytes (lesquels sont situés à la jonction de la couche basale et du derme superficiel) indique que le rayonnement a effectivement atteint la couche profonde de l'épiderme. On peut donc admettre que l'effet protecteur n'est pas total et que les cellules se multiplient, bien qu'elles aient reçu au moins une certaine quantité d'énergie.

La question de savoir si la quantité d'énergie reçue dans ces conditions est capable d'induire des désordres chromosomiques dans les générations successives des cellules issues de la culture fait l'objet du chapitre suivant.

Conclusion :

Sur 11 expériences dans lesquelles il a été possible d'obtenir une culture à la fois à partir de l'oreille gauche normale et de l'oreille droite irradiée du même animal, on s'aperçoit que la culture demeure possible même pour une dose d'irradiation préalable de 1.200 r.

Cependant on a trouvé pour les cultures à partir d'épiderme irradié un allongement du délai moyen nécessaire pour obtenir une première subculture. Ce délai moyen est de 7 jours pour le tissu témoin (en éliminant l'expérience 1 dont le délai de subculture est aberrant).

Enfin, dans les cultures issues d'épiderme irradié, les mélanocytes montrent des signes d'activité supérieure au témoin.

CHAPITRE IV

OBSERVATIONS PRÉLIMINAIRES SUR LES CHROMOSOMES DES CELLULES EN CULTURE A PARTIR DES TISSUS IRRADIÉ ET NON IRRADIÉ

L'analyse caryologique comparée des cultures de cellules établies à partir d'un tissu irradié ou non irradié suppose que trois conditions préalables sont remplies.

I - La connaissance précise du caryotype du cobaye normal est nécessaire.

II - Les cultures doivent être examinées dès la première sub-culture de manière à définir les éventuels effets précoces de l'irradiation (recherche de l'effet traumatisant de l'irradiation).

III - Il faut que les cultures irradiées et non irradiées, en provenance du même animal, maintenues exactement dans les mêmes conditions de culture, soient entretenues suffisamment longtemps pour que la présence d'éventuels mutants puisse se révéler.

On sait que des modifications dites « spontanées » peuvent survenir dans les cultures lorsque celles-ci sont dédoublées régulièrement pendant au moins plusieurs mois. La connaissance de ces éventuelles modifications « spontanées » est donc indispensable pour apprécier l'effet tardif de l'irradiation.

Nous avons essayé d'aborder chacun de ces trois points et les résultats préliminaires sont les suivants :

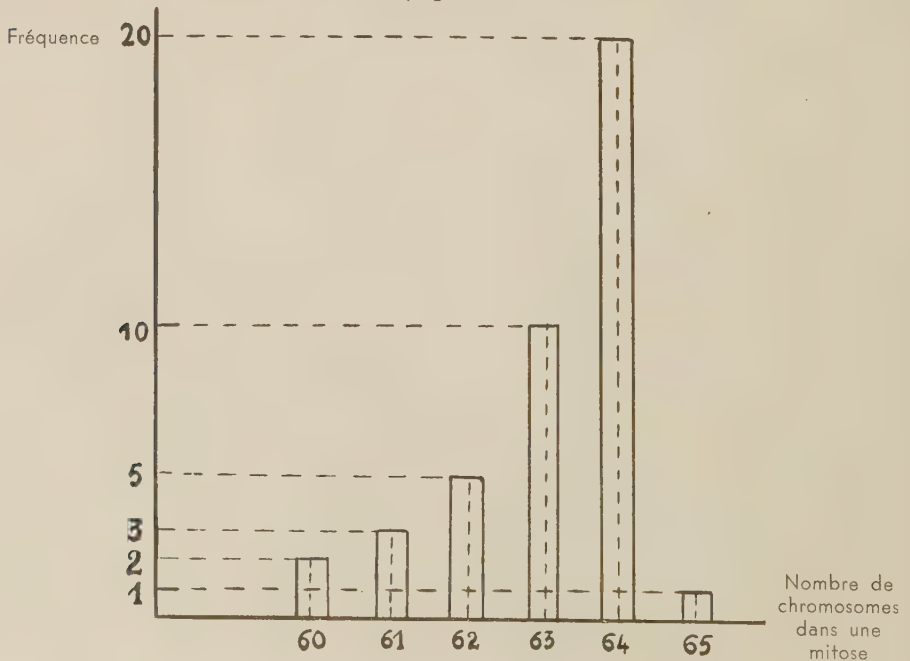
I. — LE CARYOTYPE NORMAL DU COBAYE

Il a été établi sur 42 analyses photographiques détaillées en provenance de 2 cobayes mâles et 1 cobaye femelle. Les caryotypes ont été obtenus à partir des cinquième, trente-et-unième et trente-cinquième subcultures. En ce qui concerne le nombre de chromosomes, les 42 métaphases se répartissent selon le tableau suivant qui permet la construction du caryogramme correspondant.

TABLEAU

	Nombre de Chromosomes dans les mitoses					
	60	61	62	63	64	65
Fréquence	2	3	6	10	20	1

Caryogramme



On constate à l'examen de ce caryogramme que le nombre majoritaire est de 64. Ce nombre majoritaire est vraisemblablement le nombre modal normal du cobaye. On constate aussi qu'il n'atteint pas la moitié du nombre de métaphases analysées, alors que normalement, le nombre modal diploïde dépasse 80 %. On est donc en droit de considérer qu'il existe, étant donné l'étalement du caryogramme vers les régions 63 et 62, un certain degré d'hypodiploïdie.

Cette hypodiploïdie peut s'expliquer de deux manières :

a) On peut accuser la préparation des métaphases. La dispersion des chromosomes provoquée par le séchage est extrêmement forte et les chromosomes étant pour la plupart de très petite taille, la fréquence de l'hypodiploïdie par manipulation a des chances d'être plus élevée dans le cas du cobaye que dans celui de l'homme si ce dernier est pris comme référence. Toutefois, en admettant que les valeurs de 63 chromosomes puissent être prises comme des valeurs diploïdes avec perte par manipulation, le nombre total des valeurs diploïdes avec ou sans perte atteindrait 30/42, soit 70 % environ. Il semble donc que le simple jeu des manipulations n'explique pas à lui seul cette hypodiploïdie.

b) La deuxième raison que l'on peut invoquer est celle d'une hypodiploïdie réelle survenant au cours du vieillissement des cultures. Un phénomène semblable a été observé dans le cas des cultures témoins de Hamster normal. Dans ces cellules en effet, le pourcentage global des métaphases hypodiploïdes atteint 76,6 % contre 22,3 % de diploïdes, l'établissement de cette hypodiploïdie étant observé à partir de la seizième subculture (PRUNIERAS et JACQUEMONT) (92). Or, on a indiqué plus haut que les examens pratiqués chez le cobaye ont eu lieu à la cinquième, trente-et-unième, trente-cinquième subcultures. Il est raisonnable d'envisager en conséquence, que les deux effets de manipulation et de vieillissement s'additionnent pour donner l'image hypodiploïde du caryogramme ci-dessus.

Compte tenu de cette hypodiploïdie, les chromosomes des mitoses à 64 montrent qu'il existe

11 paires de submétacentriques

19 paires d'acrocentriques parmi lesquelles 5 paires peuvent être considérées comme télacentriques,

- I paire de métacentriques
- I paire de chromosomes sexuels.

Parmi ces 32 paires, certaines sont aisément identifiables et peuvent être considérées comme les marqueurs normaux du caryotype. On distingue en effet très facilement la première paire comme étant la plus longue du caryotype et formée de chromosomes acrocentriques ou mieux subtélocentriques. On distingue également facilement une paire de métacentriques laquelle est unique et se range habituellement en dixième position. Les chromosomes sexuels sont également aisément identifiables du moins les X. Ce sont de grands chromosomes métacentriques plus petits que la première paire mais plus grands que la dixième paire. Le chromosome Y apparaît comme un submétacentrique parfois partiellement hétérochromatique dont la taille est environ la moitié du chromosome X. Les autres éléments en particulier les petits acrocentriques ou télocentriques sont d'un classement beaucoup plus difficile, en particulier les 5 plus petites paires du caryotype lesquelles ont une taille sensiblement égale, bien que les deux dernières soient sensiblement plus petites que les autres, et de ce fait mieux reconnaissables.

II. — ÉVALUATION DES ANOMALIES PRÉCOCES

L'examen a porté sur les premières subcultures de cellules provenant des épidermes irradiés à 200 r et à 600 r. Pour ces doses, et en comparant avec les cultures en provenance de l'épiderme non irradié du même animal, aucune anomalie majeure n'a été décelée. En particulier, il n'a pas été observé de translocation, de chromosome dicentrique ni de chromosome annulaire.

III. — RECHERCHE DES ANOMALIES TARDIVES

L'examen de 50 métaphases d'une culture de cellules à la trente-cinquième subculture en provenance d'un épiderme irradié, comparé à celui de la culture de cellules non irradiées en provenance du même animal et également à la trente-cinquième subculture n'a pas montré de différences grossières. L'examen de ces métaphases

à la trente-cinquième subculture n'a pas non plus révélé de différences notables avec celui des mêmes cultures de cellules à la première subculture.

Bien que ces examens n'aient pas été approfondis par des analyses photographiques détaillées ils permettent plusieurs conclusions préliminaires :

a) la poursuite de la culture jusqu'à la trente-cinquième subculture de cellules témoins, ne s'accompagne pas de la déviation vers les régions hypotétraploïdes comme dans le cas de transformations « spontanées des cultures (HSU T.C.) (35).

b) Les cellules provenant des tissus irradiés se comportent comme les cellules témoins. L'éventualité d'une mutation ne peut être éliminée mais elle n'est pas évidente.

c) Il existe une bonne correspondance entre l'aspect apparemment normal du caryotype et les caractères de croissance de la culture. Celle-ci en effet, ne montre aucun des signes habituels de la transformation, en particulier, il n'y a ni acidification du milieu, ni modification de l'aspect morphologique des cellules, ni de déviation brutale dans la courbe de croissance.

IV. — CONCLUSION

On doit souligner le caractère incomplet de cette étude caryologique. Cependant les premiers résultats apportent quelques éléments concrets :

— d'abord, ils fournissent quelques détails sur le caryotype du cobaye ;

— ensuite, ils suggèrent que jusqu'à 600 r aucune modification brutale n'apparaît dans le génome des cellules mises en culture après irradiation ;

— enfin, ils indiquent que l'étude comparée des cellules établies en culture après irradiation et sans irradiation, peut être poursuivie sur de longue durée puisque jusqu'à la trente-cinquième subculture aucune anomalie majeure n'a été observée chez les témoins.

Ces résultats sont donc négatifs en ce qui concerne l'effet de l'irradiation et ce côté négatif est dû au nombre insuffisant d'expériences, mais il ont aussi un côté positif en ce sens qu'ils faciliteront le travail de ceux qui désireront après nous s'intéresser à ce problème.

CONCLUSIONS

La première partie, relative à la technique de culture, permet de conclure que la méthode utilisée donne des résultats reproductibles.

La deuxième partie consacrée aux effets cliniques de l'irradiation amène à la conclusion que les mêmes effets épilatoires vasculaires, ulcératifs et nécrosants, peuvent être obtenus chez le cobaye comme chez l'homme, mais à la condition d'employer des doses beaucoup plus élevées (au-dessus de 1.600 r chez le cobaye) que chez l'homme.

La troisième partie consacrée à la mise en culture rapporte onze expériences valables dans lesquelles la culture a été obtenue à partir de l'oreille gauche normale et de l'oreille droite irradiée du même animal. Elle montre que la culture est toujours possible même après une irradiation de 1.200 r. Cependant, les cellules en provenance du tissu irradié démarrent moins vite que les témoins et les mélanocytes du tissu irradié sont plus actifs que les mélanocytes témoins.

Dans la quatrième partie 42 analyses photographiques de métaphases de cobayes normal fournissent les premiers éléments de

base pour l'appréciation de l'effet de l'irradiation de l'épiderme avant sa mise en culture. Les observations préliminaires sur les cultures obtenues à partir d'épiderme irradié à 200 r et à 600 r, ne montrent pas de grosses altérations chromosomiques.

Vu :

Le Doyen,

Pour le Doyen :

l'Assesseur :

LEVRAT.

Le Président de la Thèse,

PAPILLON.

Vu et permis d'imprimer :

LYON, le 25 Novembre 1965

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université,

P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

1. ABERCROMBIE (M.) et HEAYSMAN (J.E.M.). — Observations on the social behaviour of cells in tissue culture II « Monolayering » of fibroblasts. *Exptl Cell Res.* **6**, 1954, 293-306.
2. ABERCROMBIE (M.), HEAYSMAN (J.E.M.) et KARTHAUSER (H.H.) — Social behaviour of cells and fibroblasts, *Expt. Cell. Res.* **13**, 1957, 276-91.
3. AFRIKANOVA (L.A.) en Russe. — Nécrose aiguë de la peau provoquée par les Rayons X. *Ark. Patol. S.S.S.R.* (1961, **23**, n° 3, 26-33.
4. ANDRIJUK (K.I.) (Inst. Microbiol. Acad. Sci. Ukraine). — Influence des rayons gamma sur quelques propriétés biologiques de bacillus Breslau. *Microbiol. Zh. Ukraine R.S.R.* (1960), **22**, n° 3, 53-7.
5. ASTAOUROV (B.L.) en Russe. — Mécanisme primaire de l'action biologique des rayons. Moscou, 1963, 140-161.
6. CIER (A.), TINE (J.) et NOFRE (C.). — Etude comparée chez la souris des effets radio-protecteurs de quelques cations. *C.R. Soc. biol. Paris*, **157**, 1963, 1596-9.
7. CIER (A.), MAIGROT (J.C.) et NOFRE (C.). — Effets des anions minéraux sur la radiosensibilité de la souris. *C.R. Acad. Sc. Paris*, **259**, 1964, 3656-3658.
8. CHU (E.H.Y.) et MONESI (U.) (Oak Ridge Nation. Lab. Tenn.). — Analysis of X ray induced chromosome aberrations in mouse somatic cells i nvitro. *Genetic U.S.A.* 1960, **45**, n° 8, 981.
9. CRUICKSHANK (C.N.D.), COOPER (J.R.) et HOOPER (C.). — The cultivation of cells from adult epidermis. *J. Invest Dermat.* **34**, 1960, 339-342.
10. CRUICKSHANK (C.N.D.), COOPER (J.R.) et CONRAN (M.B.). — A new tissue culture chamber. *Expetl cell. Res.* **16**, 1959, 695-698.
12. BACQ (Z.) et ALEXANDER (P.). — Fundamentals of Radiobiology. London, 1961.

13. BASES (R.E.). — Some applications of tissue culture methods to radiation reserch. *Cancer res.* **19**, 1959, 311-315.
14. BENDER (M.A.) — X rays induced chromosome aberrations in normal diploid human tissue culture. *Genetics (U.S.A.)* 1957.
15. BENDER (M.A.). — (Oak Ridge Nation. Lab. Ten.), *Genetics (U.S.A.)* **45**, n° 8, 1960, 975.
16. BASSETT (C.A.L.), EVANS (V.J.) et EARLE (W.R.) — *Plast. Reconst. Surg.* **17**, 1956, 421-429.
17. BILLINGHAM (R.E.). et REYNOLDS (J.). — *Brit. J. Plast. Surg.* **23**, 1952, 25-36.
18. BLAIR (H.A.) dans « First U.N. Int. Conf. On the Peaceful uses of atomic energy ». Genève **11**, 1955, 133.
20. BOUEVITCH (I.U.A.), KARABAEV (E.M.) et KORODINE (V.I.). — *Radiobiologia* **2**, 1963, 197.
21. BLOCKER (G. Jr), POMERAT (C.M.) et LÉWIS (S.R.) — *Plast. Reconst. Surg.* **5**, 1950, 283-288.
22. DIMITRIEVA (E.V.). — *Arch. Anat. Histol. Embriol.* **39**, 1960, 11-22.
23. DAVIDSON (G.O.). — Conséquences biologiques de l'irradiation totale par les rayons gamma chez l'homme (en russe). Moscou 1960.
24. EARLE (W.R.), SANFORD (K.K.), EVANS (V.J.) WALTZ (H.K.) et SHANNON (J.E.). — *J. Nation. Cancer Inst.* **12**, 1951, 133.
25. EFROIMSON (V.P.) (en russe). — *Bjull. Moskov Obshch Ispytatel Otd. biol.* **65**, n° 6, 1961, 109-28.
26. FEDOROFF (S.). — Effect of human blood serum on tissue culture. I - Some properties and specificity of toxic human serum and its interaction with strain L. cells. *Texas Rep. Biol.* **16**, 1958, 31-47.
27. FISCHER (H.W.) et PUCK (T.T.). — On the function of X-irradiated feeder cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* In press.
28. FRIEDENWALD (J.J.) et SIGELMAN. — The influence of ionizing radiation on mitotic activity in the rat's corneal epithelium. *Cancer Research* **4**, 1953, 1.
29. GEY (G.), HANKS (J.H.) et BARRETT (R.). — *Growth* **12**, 1948, 69-105.
30. GOLDFERER (A.). — The effects of radiation on mammalian tissue cells normal and malignant. *Cancer Research* **8**, 1948, 383.

31. GRAEVSKY (E. Ia.) et SHAPIRO (I.M.). — Sur la destruction et la réparation des cellules dans l'organisme radiolésé (en russe). *Ousp. Sovr. Biol.* **47** (2), 1959, 186-203.
32. HAYFLICK (L.) et MOORHEAD (P.S.). — *Exp. Cell. Res.* **25**, 1961, 585-21.
33. HEITE (H.J.) et MACHER (E.). — *Dermatol. Klin. Univ. Marburg/Lahn Strahlentherapie Dtsch* **114**, n° 2, 1961, 274-80.
34. HEWITT (H.B.) et WILSON (C.W.). — *Brit. J. Cancer.* **13**, 1959, 69.
35. HSU (T.C.). — *Inter. Rev. Cytol.* **12**, 1961, 69-145.
36. KARABAEV (E.M.), KOROGODINE (V.I.). — Sur le rôle de l'oxygène dans la restauration des cellules irradiées (en russe). *J. Obтч. Biol.* **23** (2), 1962, 150-152.
37. KARABAEV (E.M.) et KOROGODINE (V.I.). — *Radiobiologia* **1** (5), 1961, 653-658.
38. KHOUSSAR (I.U.P.). — *Arch. Anat. Histol. Embryol.* **42**, 1962, 59-65.
39. KIMBALL (R.F.), GAITHER (N.) et WILSON (S.). — *Radiation Res.* **5**, 1956, 485.
40. KOLAR (J.), VRABEC (R.) et KRALZ. — On sarcome formation in radiation injured skin. *Fortschr. Roentgens. Nuklearmed* **91**, 1959, 312-6.
41. KOLAR (J.) et VRABEC (R.). — Observations on X-rays ulcers of the skin. Aradiobiological study of 300 cases. *Strahlentherapie* **112**, 1960, 309-21.
42. KOLLER (P.C.). — The effects of radiation on the normal and malignant cells in man. *Brit. J. Radio. suppl.* **1**, 1947.
43. KOHN (H.I.) et FOGH (J.). — Some prompt and delayed effects of X-rays on the growth of human amnion cells in tissue culture. *J. Natl. Cancer. Inst.* **23**, 1959, 293-304.
44. KOROGODINE (V.I.). — *Biophysika* **3**, 1958, 703 (en russe).
45. KOROGODINE (V.I.), MALIUTINA (T.S.). — *Priroda* **10**, 1959, 82 (en russe).
46. KOROGODINE (V.I.), BILOUCHI (V.), MARKOVA (L.I.) et SHECHTMAN (Ia. L.). — *Radiobiologia*, **3**, 1963, 39.
47. KOROGODINE (V.I.) et LIU AI-CHEN. *Cytologia* **1** (4), 1959, 379-386.
48. KOROGODINE (V.I.) et MALINOVSKY. — *Cytologia* **1** (4), 1959, 306-315.

49. LASER (H.) et HALBERSTAEDTER (L.). — Zeitschr. f. Krebsf. **29**, 1929, 411.
50. LACASSAGNE (A.). — C.R. Soc. Biol. **125**, 1937, 96.
51. LATARJET (R.) et GRAY (L.H.). — Act. Radiol. **41**, 1954, 61.
52. LATARJET (R.). — C.R. Acad. Sci. **217**, 1943, 186.
53. LATARJET (R.). — Acta Radiol. **41**, 1954, 48.
54. LATARJET (R.), LARTIGUE et ESTIENNE (E.). — C.R. Acad. Sci. **252**, 1961, 948-50.
55. LAWRENCE (C.W.). — The effect of the irradiation of different stages in microsporogenesis on chiasma frequency. Heredity **G.B.** **16**, 1961, 83-9.
56. LEJTES (F.L.). Inst. Rech. Sanit. Physiol. — Altérations morphologiques cutanées après irradiation externe par les rayons alpha. Bjull. Eksper. Biol. Medi. S.S.R. **48**, 1959, n° 11113-7.
57. LEA (D.E.). — Actions of radiation on living cells. Seconde Edition, chap. IX. Cambridge University Press England, 1956.
58. LEWIS (S.R.), POMERAT (C.M.), EZELL (D.). — Anat. Rec. **104**, 1949, 487-503.
59. LIEGNER (L.M.), MICHAUD (N.J.). — St Luke Hospital New-York. Skin and subcutaneous reactions induced by supervoltage irradiation. Amer. J. Roentgen. Radiumtherap. Nucl. Med. **85**, 1961, n° 3, 535-49.
60. LOUTCHNIK (N.V.) et TSARAPKINE (L.S.). — C.R. Acad. Sci. U.R.S.S. **124**, 1959, 213.
61. LOUTCHNIK (N.V.), IZMOJEROV (N.A.), PORIADKOVA (N.A.), TSARAPKINE (L.S.) et TIMOFEOFF RESSOVSKY. — Reversibilité des lésions cytogénétiques provoqués par les radiations. Conf. 29-31 Mai 1962 (en russe).
62. LOUTCHNIK (N.V.), PORODKOVA (N.A.), TSARAPKINE (L.S.) et TIMOFEOFF RESSOVSKY. — Dans « la restauration des radio-lésions. Conf. 29-31 Mai 1962 (en russe), p. 3, Moscou.
63. LOUTCHNIK (N.V.). — Nature des radiolésions cytogénétiques primaires et activité catalytique des chromosomes.
64. LOVO (G.F.). — Radiodermatis of the extremities. Histological aspects and reparative criteria. G. Ital. Derm. **100**, 1959, 483-93.
65. LUDFORD (R.J.). — Cytological changes after radiation of malignant growth. Sci. Rep. Imp. Cancer. Res. Fondation **10**, 1932, 125.
66. LURIA (S.E.). — 1953 Animal Virology. 39 Wiley and sons New-York.

67. MAINX (F.). — Les dangers d'altérations héréditaires dus à l'emploi de l'énergie atomique. *Münsch. Med. Wschr.* **98**, n° 19, 673-75.
68. MAGGIORA (A.) et BRUN (R.). — Action des rayons X sur le flanc du cobaye. *Dermatologica Suisse* 1962, **125**, n° 2, 112-6.
69. MARCOVITCH (H.). — Les conséquences génétiques possibles chez l'homme de l'exposition aux radiations ionisantes. *Rev. Franç. et Clin. Biol.* **1**, n° 9, 1956.
70. MARCUS (P.I.), CIECIURA (J.J.) et PUCK (T.T.). — Clonal growth in vitro of epithelial cells from normal human tissues. *J. Exptl. Med.* **104**, 1956, 615.
71. MATTHEY (R.). — L'action des radiations sur le patrimoine héréditaire. *Praxis* 11 Oct. 1956, n° 41, 929-931.
72. MASSON (P.). — Mélanoblastes et cellules de Langerhans. *Bull. Soc. Fr. Derm. Syph.* **42**, 1935, 112-118.
73. MELLETT (P.G.), WALTER (J.B.) et HOUGHTON (L.E.). — Two phases ulceration in guineapig askin following local irradiation with X - rays. *Brit. J. Exper. Pathol.* **41**, 1960, n° 2, 160-8.
74. MEDAWAR (P.B.). — Sheets of pure epidermal epithelium from human skin. *Nature* **148**, 1941, 783.
75. MILLER (R.W.). — *Am. J. Dis. Child.* **90**, n° 5, 1955, 646.
76. MILLER (R.W.). — *Pediatrics* **18**, n° 1, 1956, 1-18.
77. MORDINOVA (N.P.) Moscou. — Altération trophique des tissus irradiés. *Vest. Roentgen. Radiol. S.S.S.R.* **34**, n° 6, 1959, 58-62.
78. MORKOVIN (D.) et A. FELDMAN. End point of the actions of radiation on living tissue in radiation therapy. *Brit. J. Radiol.* **33**, 197, 1960.
79. MOON (L.E.), HARLOW (H.F.) et BOGUMILL (G.P.). — Quelques effets de l'application des rayons X pendant un temps prolongé.
80. PARSHLEY (M.S.) et SIMMS (H.S.). — Conditions favoring the growth of adult skin epithelium in vitro. *Anat. Rec.* **94**, 1946, 486-87.
81. PARSHLEY (M.S.) et SIMMS (H.S.). — Cultivation of adult skin epithelial cells (chicken and human) in vitro. *Am. J. Anat.* **86**, 1950, 163-189.
82. PATERSON (E.). — A comparison of the action of X and-gamma radiation on fibroblasts. *Brit. J. Radiol.* **15**, 1942, 257-263.
83. PERRY (V.P.), EVANS (V.J.), EARLE (W.R.), HYATT (G.W.) et BEDELL (W.C.). — Long term tissue culture of human skin. *Am. J. Hyg.* **63**, 1956, 53-58.

84. PERRY (V.P.), SANFORD (K.K.), EVANS (V.J.), HYATT (G.W.) et EARLE (W.R.). — Establishment of clones of epithelial cells from human skin. *J. Nat. Cancer. Inst.* **18**, 1957, 709-717.
85. PAPILLON (J.), DARDAILLON (A.) et LACORRE (J.). — La radiothérapie de contact dans les épithéliomas du pavillon de l'oreille. *J. Radiol. Electrol.* **31**, 1950, 197-98.
86. PAPILLON (J.), VIOLLAND (R.). — Résultats d'un an de radiothérapie de contact au centre anticancéreux de Lyon. Statistique de 300 observations. *J. Méd. Lyon* **30**, 1949, 631-639.
87. PRUNIERAS (M.), BONJEAN (M.), CHARDONNET (Y.) et MILLET (P.). — Etude sur la trypsination de l'épiderme humain. *Bull. Soc. Fr. Derm. Syph.* **64**, 1957, 439.
88. PRUNIERAS (M.) et CHARDONNET (Y.). — Etude microcinématographique en contraste interférentiel des cellules épidermiques cultivées in vitro. *Path. Biol.* **8**, 1960, 687-696.
89. PRUNIERAS (M.), GATE (A.) et BONJEAN (M.). — Culture in vitro d'épiderme humain. *Path. Biol.* **6**, 1958, 1561-66.
90. PRUNIERAS (M.), LEUNG (T.K.) et COLSON (P.). — *Ann. Derm.* **91**, 1964, 23-27.
91. PRUNIERAS (M.) et CHEVALIER. *Ann. Inst. Pasteur* **106**, 1964, 571-74.
92. PRUNIERAS (M.), MATHIVON (M.F.), LEUNG (T.K.) et GAZZOLO (L.). — Culture euploïde de cellules épidermiques adultes en couches monocellulaires. *Ann. Inst. Pasteur* **108**, 1965, 149-165.
- 92a. PRUNIERAS (M.) et JACQUEMONT (C.). — Etude sur les rapports virus chromosomes. *Ann. Inst. Pasteur* **109**, 1965, 185-203.
93. POMERAT (C.M.), KENT (S.P.) et LOGIE (L.C.). — Irradiation of cells in tissue culture. *Zeitschrift. F. Zell forschg* **47**, 1957, 158-174.
94. POMERAT (C.M.). — Cellular changes induced by radiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **71**, 1958, 1143-1155.
95. PINKUS (H.), STARICCO (R.G.), KROPP (P.J.) et FAN (J.). — The symbiosis of melanocyte and human epidermis under normal and abnormal conditions. In « Pigment cell. Biology » M. Gordon Editor (New-York). Acad. Press. 1959, 127-138.
96. PUCK (T.T.), MARCUS (P.I.) et CIECIURA (S.J.). — Clonal growth of mammalian cells in vitro. *J. Exptl. Med.* **103**, 1956, 273-284.
97. PUCK (T.T.) et MARCUS (P.I.). — Action of X rays on mamalian cells. *J. Exptl. Med.* **103**, 653-66, 1956.

98. PUCK (T.T.), MORKOVIN (D.), MARCUS (P.I.) et CIECIURA (S.J.). — Actions of X rays on mammalian cells. II - Survival curves of cells from normal human tissues. *J. Exptl. Med.* **106**, 1957, 485.
 99. PUCK (T.T.) et MARCUS (P.I.). — A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture : the use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **41**, 1955, 432.
 100. REID (T.R.) et GIFFORD (M.P.). — A quantitative study of the effect of X-radiation on cells in vitro. *J. Nat. Cancer. Inst.* **13**, 1952, 431.
 101. REID (T.R.). — The effect of X rays on cells cultivated in vitro II Recovery factor. *Brit. J. Radiol.* **16**, 1943, 61.
 102. SEGARD (E.), MONTREUIL (J.), COLBEAU (A.), DEMAILLE (A.) et DRIESSENS (J.). — Isolement des cellules vivantes à partir de tissus animaux. Etude critique des méthodes classiques et description de deux techniques originales. *C. R. Acad. Sci.* **255**, 1962, 1479-1481.
 103. STEINBERG (M.S.) « E.C.M. ». — Its nature, origin and function in cell aggregation. *Exptl. Cell. Res.* **30**, 1963, 257-279.
 104. STROHL (A.). — Dans « Précis de Physique Médicale » : Propriétés générales des rayons X. Masson et Cie, Editeurs.
 105. UMIN' (Inst. Oncol. Expp. Clin. Moscou). — Action d'une forte dose unique des rayons X sur la durée de vie des cellules cultivées in vitro chez l'homme et la souris. *Arkh. Anat. Embryol. S.S.S.R.* **42**, 1962, 67-72.
 106. TOLMACH (L.J.), MARCUS (P.I.). — *Exptl. Cell. Res.* **20**, 1960, 350.
 107. TOLMACH (L.J.), ROSSEL (A.J.) et RITTER (R.D.) — *Radiation Res.* **12**, 1960, 480.
 108. VENKATESWARLY (K.), PADMANABHA et PILLA (S.). — X rays diffraction by hairs and feathers. *J. Appli. Polym. Sci. U.S.A.* **4**, n° 11, 1960, 175-8.
 109. WHEELER (C.E.), CANBY (C.M.) et CAWLEY (E.P.). — Long term tissue culture of epithelial like cells from human skin. *J. Invest. Derm.* **29**, 1957, 383-92.
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	19
CHAPITRE PREMIER. — Méthode de mise en culture de l'épiderme de cobaye normal	23
I - Matériel	25
II - Les conditions expérimentales	29
III - Les résultats	33
IV - Conclusion	37
CHAPITRE II. — Effets cliniques de l'irradiation au niveau des zones destinées au prélèvement des échantillons d'épiderme à mettre en culture	39
I - Les conditions expérimentales	41
II - Les résultats	42
III - Conclusion	47
CHAPITRE III. — Etude du pouvoir de pousse en culture de l'épiderme irradié et non irradié prélevé sur le même animal	49
I - Protocole	50
II - Les conditions expérimentales	50
III - Les résultats	50
CHAPITRE IV. — Observations préliminaires sur les chromosomes des cellules en culture à partir des tissus irradié et non irradié	57
I - Caryotype normal du cobaye	58
II - Evaluation des anomalies précoces	60
III - Recherche des anomalies tardives	60
IV - Conclusion	61
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	63
BIBLIOGRAPHIE	65

